

**Über die Ausscheidung der
17-ketogenen Steroide im Urin
während des Kindesalters**

Inge Brüning, geb. Herzer

Druck: Anneliese Schubert, München 5, Corneliusstraße 21, Telefon 21777

AUS DER KINDER-KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. WISKOTT

ÜBER DIE AUSSCHIEDUNG
DER 17 - KETOGENEN STEROIDE
IM URIN WÄHREND DES KINDESALTERS

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Inge Brüning, geb. Herzer

aus Würzburg



München 1959

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. A. WISKOTT

Dekan: Professor Dr. K. KOLLE

Tag der mündlichen Prüfung: 17. März 1959

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG

I. FUNKTION DER NNR:

- Hormone der NNR und ihre Wirkungen
- Sekretionsleistung der NNR
- Biosynthese der NNR-Hormone
- Stoffwechsel der NNR-Hormone
- Die 17-Ketosteroide

II. BESTIMMUNGSMETHODEN DER CORTICOSTEROIDE:

- Biologische Tests
- Chemische Bestimmungen
 - (Hydrolyse, Extraktion, Reinigung und Fraktionierung)
- Cst-Bestimmungen im Harn mit Normalwerten
- Cst-Bestimmungen im peripheren Blut und spezielle Bestimmungsverfahren

III. METHODE DER 17-KGS-BESTIMMUNG:

- Wahl der Methode
- Entwicklung der Methode
- Spezifität der Methode
- Einfluß der verschiedenen experiment. Bedingungen
- Colorimetrie

IV. EIGENE UNTERSUCHUNGEN:

- Methode und Material
- Ergebnisse:
 - Erklärung der Kurven
 - (Gruppeneinteilung und stat. Auswertung)
 - Untersuchung der 17-KS mit Kurven und Tabellen
 - Untersuchung der 17-KGS mit Kurven und Tabellen
 - Untersuchung nach Zufuhr von ACTH (mit Kurven und Tabellen)

V. ERGEBNISSE NEUER ARBEITEN ÜBER 17-KGS:

- Normalwerte
- Physiolog. und patholog. Einflüsse auf die 17-KGS und 17-KS-Ausscheidung

ZUSAMMENFASSUNG

LITERATURVERZEICHNIS

Seit es gelungen ist, Nebennierenrinden-Präparate synthetisch herzustellen, haben sie sich in allen medizinischen Fachgebieten einen breiten Anwendungsbereich erobert.

Trotz der großen Arbeit, welche die medizinische und chemische Forschung bereits auf dem Gebiet der NNR-Hormone geleistet hat, ist das Eingreifen dieser Wirkstoffe in den Organismus noch immer nicht ganz geklärt und ihre therapeut. Verwendung vielfach nur auf klin. Erfahrung gestützt. Es ergibt sich also die Notwendigkeit, diese empirisch gefundenen Wirkungen durch zuverlässige Methoden kontrollieren zu können.

Dazu sind eine ganze Reihe mehr oder minder brauchbarer Nachweisverfahren der Rindenhormone ausgearbeitet worden.

Die Bestimmung der 17-ketogenen Steroide im Urin nach NORYM-BERSKI (1953) erscheint dabei eine für klinische Zwecke brauchbare und zuverlässige Methode zu sein. Im Rahmen von Untersuchungen über die Verwertbarkeit dieses Verfahrens habe ich die Aufgabe übernommen, Normalwerte von Kindern festzustellen. An den Anfang dieser Arbeit wurde ein Überblick über die Wirkungsweise und den Stoffwechsel der Corticosteroide gestellt. Infolge der umfangreichen, ständig fortschreitenden Untersuchungsergebnisse kann diese Übersicht jedoch keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben.

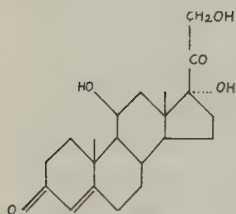
Die Aufzählung der anderen bisher üblichen Bestimmungsmethoden soll einen Vergleich mit der von uns ausgeführten Methode und den gefundenen Werten ermöglichen.

I. FUNKTION DER NEBENNIERENRINDE

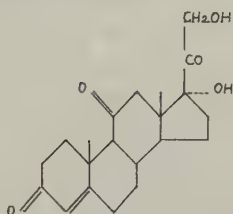
HORMONE DER NNR UND IHRE WIRKUNGEN

Der englische Arzt, Thomas ADDISON erkannte schon 1855, daß die Symptome der "BRONZE-Krankheit" durch eine chron. NNR-Insuffizienz hervorgerufen werden. Die nach ihm benannte Krankheit beruht auf einer Zerstörung, Atrophie oder Hypoplasie der NNR und kann heute durch Hormonsubstitutionstherapie beherrscht werden. Ein Jahr später 1856 bestätigte BROWN-SÉQUARD durch die operative Entfernung der NN bei Tieren die Lebensnotwendigkeit dieses kleinen Organes. 1927 gelang es ROGOFF und STEWART, aus der NN einen wirksamen Extrakt zu gewinnen. Den entscheidenden Schritt unternahmen dann SWINGLE und PFIFFNER (1930). Sie konnten mit ihren Experimenten beweisen, daß diese Extrakte die Ausfallerscheinungen der adrenal-ektomierten Tiere in kürzester Zeit beseitigen oder ihr Leben verlängern. Im Laufe des folgenden Jahrzehntes beschäftigten sich vor allem die Arbeitskreise um REICHSTEIN in Zürich, KENDALL in Rochester, (Minnesota) u. WINTERSTEINER an der Columbia-Universität in New-York mit Untersuchungen der NNR-Hormone. Ihnen hauptsächlich verdanken wir die weiteren Fortschritte. Sie konnten aus den wirksamen Konzentraten die Hormone als kristalline Substanzen isolieren und ihre Konstitution aufklären. Dadurch war es möglich geworden, die meisten dieser Hormone synthetisch herzustellen. Seither wurden aus der NNR über 30 verschiedene Substanzen gewonnen. Chemisch erwiesen sie sich alle als Steroide. Und zwar fand man neben androgenen, gestagenen und östrogenen Stoffen vor allem C_{21} -Steroide. Diese nur in der NNR gebildeten Stoffe bezeichnete man als Corticosteroide (Cst). Es handelt sich dabei um Pregnan- oder Allopregnan-Derivate, die als typisches Strukturdetail eine α -Ketol- oder Glykol-Seitenkette, eine Δ^4 ungesättigte 3-Ketogruppe, eine 11-Keto-, 11-Hydroxyl oder 17-Hydroxylgruppe tragen. Nur ein kleiner Teil von ihnen ist jedoch biologisch wirksam und läßt so die "Cortinaktivität" von NNR-Extrakten auf die Ausfallerscheinungen adrenal-ektom. Tiere erklären.

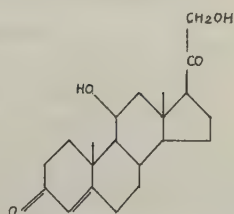
1. CORTISOL


 Δ^5 -pregnen - 11 β , 17 α ,
21 triol - 3, 20 - dion

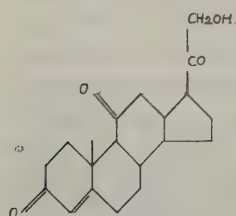
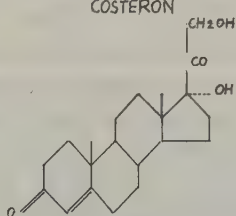
2. CORTISON


 Δ^5 -pregnen - 17 α , 21 diol
- 3, 11, 20 - trion

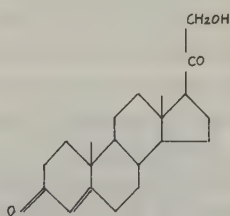
3. CORTICOSTERON


 Δ^5 -pregnen - 11 β - 21-diol -
3, 20 - dion

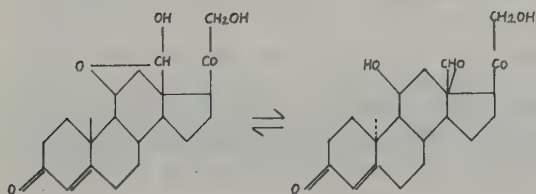
4. 11-DEHYDROCORTICOSTERON


 Δ^5 -pregnen - 21-ol -
3, 11, 20 - trion
5. 11-DESOXY-
17-HYDROXYCORTI-
COSTERON
 Δ^5 -pregnen - 17 α ,
21-diol - 3, 20 - dion

6. CORTEXON


 Δ^5 -pregnen - 21-ol -
3, 20 - dion

7. ALDOSTERON



Aldehydform

Bei den inaktiven Steroiden ist entweder die α, β -ungesättigte 3-Ketogruppe oder die α -Ketolseitenkette (an C_{17}) reduziert.

Die wichtigsten aktiven Cst. sind:

1. Cortisol (Hydrocortison, 17-Oxy-Corticosteron
Kendalls Compound F, Reichsteins Subst. M)
2. Cortison (Kendalls Compound E, Reichsteins Subst. Fa.)
3. Corticosteron (Kendalls Compound B, Reichsteins Subst. H)
4. 11-Dehydrocorticosteron (Compound A)
5. 17-Hydroxycortexon (Reichsteins Subst. S)
6. Cortexon (11-Desoxycorticosteron, DOC,)
(Reichsteins Subst. Q)
7. Elektrocortin-o. Aldosteron. (Formeln s. Beilage)

Nach dem Hauptgewicht ihrer im Organismus entfalteten Wirkungen erfolgte eine Einteilung in Mineralo- und Gluko-Cst. Eine solche strenge Aufgliederung ist heute nicht mehr befriedigend, da alle bekannten NNR-Hormone sowohl in den Elektrolyt-, wie auch in den Kohlehydrathaushalt regulierend eingreifen.

Allerdings ist ihre Wirkweise qualitativ und quantitativ verschieden. Sie bilden gleichsam ein kontinuierliches Hormonspektrum. Auf der einen Seite steht Cortisol mit der stärksten Wirkung auf den Kohlehydratstoffwechsel. Dann nimmt dieser Einfluß ab, während die Elektrolytwirksamkeit immer stärker hervortritt. Cortexon galt bis zur Entdeckung von Aldosteron (GRUNDY, SIMPSON und TAIT, 1952) als stärkstes Mineral-Cst.

Aldosteron steht außer dieser Reihe: Es übertrifft nicht nur das Cortexon in seiner Mineralaktivität, sondern besitzt daneben auch noch einen erheblichen Einfluß auf den Kohlehydrathaushalt.

Durch seine Entdeckung wurde auch die Einteilung in 11-Oxy- und 11-Desoxy-Cst und ihre Gleichsetzung mit Gluko- bzw. Mineralo-Cst überholt. Aldosteron trägt trotz seiner großen Mineralwirksamkeit eine 11-Oxygruppe.

Durch geeignete biologische Testmethoden (s. später), meist an nebnierenlosen Tieren war es möglich, die Eigenschaften der einzelnen Steroide genauer zu prüfen. Wertvolle Anhaltspunkte lieferten

auch die klinischen Erscheinungen und die therapeutischen Versuche mit Hormonen bei NNR-Erkrankungen.

So erkannte man die große Bedeutung der NNR-Hormone in der Regulierung des Wasser- und Mineralhaushaltes.

Sie bewirken eine Retention von Wasser, Natrium, Chlor und Bicarbonat und fördern die Ausscheidung von Kalium. Man vermutet, daß sie am tubulären Apparat der Niere angreifen. Somit bestimmen sie den osmotischen Druck innerhalb und außerhalb der Zelle, regeln das Säurebasengleichgewicht und beeinflussen die Zellfunktion und die Erregbarkeit der Muskeln und Nerven. Sie greifen in die Kreislaufdynamik ein und halten den Blutdruck konstant.

Klinisch macht sich eine mangelnde Rindenhormonproduktion (Hypocortizismus) durch Hypotonie und Kollapsneigung, Adynamie und Asthenie der Patienten bemerkbar (Morbus Addison). Durch Behandlung mit Aldosteron und Cortexon können diese Symptome aufgehoben werden. Aldosteron soll 20 - 40 mal wirksamer sein als Cortexon (MACH u.a. 1954, MÜLLER u.a. 1955), dabei aber keinen Einfluß auf die Wasserausscheidung besitzen (DESAULES u.a. 1953) (TUCHMAN-DUPLESSIS 1955, GROSS 1956).

Bei einer Überfunktion der NNR (Hypercortizismus) wird oft nur eine Wirkstoffgruppe vermehrt produziert, z.B. Aldosteron (Conn-Syndrom oder primärer Aldosteronismus). Dieses Hormon scheint auch in der Ödempathogenese eine wesentliche Rolle zu spielen, da man bei Nephrose, hydrop. Herzinsuffizienz usw. auffallend hohe Aldosteronwerte im Urin fand (LUETSCHER und CURTIS 1955, LUETSCHER u.a. 1955). Als Ursache kommt dabei einerseits Na-Verarmung bzw. Vermehrung des Serumkaliumgehaltes (BECK u.a. 1955, LUETSCHER u. AXELROD 1954), oder andererseits ein verzögerter Abbau in einer geschädigten Leber in Frage (ZEISEL u. STRÖDER 1957) (Secund. Aldosteronismus).

Die Symptome des morbus Cushing, Fettansatz, Hyperglykämie und Hypertonus sind durch eine Überproduktion von Gluko-Cst. bedingt. Durch Zufuhr dieser Hormongruppe, vor allem von Cortison, steigt der Blutzuckergehalt, da die Glukogenese und Neoglukogenese

angeregt und die periphere Verbrennung vermindert wird. Diese diabetogene Wirkung wird allerdings unter normalen Umständen durch eine Hypersekretion von Insulin gehemmt.

Eng verknüpft mit der Wirkung auf den Kohlehydrathaushalt ist der Einfluß der Gluko-Cst auf den Eiweißstoffwechsel. Die Proteinassimilation wird gehemmt, der Abbau von Eiweiß zu Aminosäuren gesteigert. Entsprechend nimmt die Ausscheidung von Stickstoff, Harnstoff und Kreatinin im Urin zu. So kommt es durch hohe Dosierung von ACTH und Cortison zur Verminderung des Proteingehaltes des Skeletts, der Muskulatur und des Integumentes und das Körperwachstum wird verlangsamt.

Der Einfluß der NNR-Hormone auf den Fettstoffwechsel ist noch weniger geklärt (HARTMANN und BROWNELL, 1949). Bei Mangel tritt eine Abnahme der Fettspeicherung ein. ACTH führt zur Mobilisierung der Gewebsfette, Vermehrung der Blutlipide und Auftreten von Ketonkörpern (TUCHMANN - DUPLESSIS, 1955).

Die Beeinflussung des blutbildenden Systems macht sich im Abfall der eosinophilen Zellen, Neutrophilie, und Lymphopenie durch Förderung der Lympholyse bemerkbar. Weiter kann man eine vermehrte Antikörperbildung und Förderung der phagozytären Funktion des RES feststellen.

Die entzündungshemmende und mesenchymostatische Eigenschaft von Cortison und Cortisol leistet vor allem bei der Therapie rheumatischer Erkrankungen und allergischer Zustände große Hilfe.

SEKRETIONSLEISTUNG DER NNR

Unter physiologischen Bedingungen finden sich bei Mensch und Tier vor allem Cortisol, Corticosteron und Aldosteron, sowie das androgen wirksame 11β -Hydroxyandrostendion im NN-Venenblut. (BUSH 1953). Andere Stoffe mit hoher biologischer Aktivität wie Cortison, Cortexon, Compound A und Substanz S wurden erst bei der chemischen Aufarbeitung gefunden. Man nimmt an, daß es sich dabei um Vorstufen oder Metaboliten der genuinen Hormone handelt. Cortexon kann z.B. unter

bestimmten Bedingungen in Corticosteron oder Aldosteron umgewandelt werden (KAHNT, NEHER u. WETTSTEIN 1955).

Bei der Aufarbeitung menschl. Nebennieren war Hydrocortison das in größter Menge vorkommende Steroid. Seine Konzentration betrug 2,3-5,5 μ g pro/g NN-Gewebe (HUDSON u. LOMBARDO 1955). Die Extraktion der NN selbst ist aber nur ein sehr grobes und unzuverlässiges Verfahren, da die gefundenen Stoffe keineswegs auch ins Blut abgegeben werden müssen.

Die Gewinnung von NN-Venenblut zu Untersuchungszwecken war meist nur bei Operationen möglich. Wegen der dabei unvermeidbaren Stresswirkung, den pathol. Bedingungen und ev. vorausgegangenen Hormonbehandlungen, sind die Ergebnisse auch nur bedingt verwertbar.

Bei Patienten mit Mamma-Carzinom fand SWEAT u.a. (1953) 290 μ g Hydrocortison und 80 μ g Corticosteron in 100 ccm Venenblut. HUDSON u. LOMBARDO (1955) erhielten bei anderen Mamma-Ca-Fällen Hydrocortisonwerte von 1006 - 253 μ g/100 ccm Blut. Bei einem m. Cushing-Fall konnten 850 μ g Hydrocortison und 236 μ g Corticosteron/100 ccm Blut nachgewiesen werden (SWEAT u.a. 1953). ROMANOFF u.a. (1953) gelang es, aus dem NN-Venenblut eines wegen metastas. Prostata-Carzinom adrenalect. Mannes 4,5 mg Hydrocortison und 0,4 mg Corticosteron kristallin zu gewinnen.

Versuche, mit dem Venenkatheder direkt Blut aus der NN-Vene zu entnehmen, sind wegen des versteckten Zuganges sehr schwierig (PINCUS u. ROMANOFF, 1955)

BONDY u. ALTROCK (1953) bestimmten die 17-OxyCst. im Kathederblut der linken Nierenvene unter gleichzeitiger Berechnung der Nierendurchblutung und erhielten ein Sekretionsmittel von 10,4 μ g/min., bzw. 23,7 mg/24 Std. Nach Zugabe von ACTH trat eine Erhöhung auf 43,1 μ g/min. u. 62,1 mg/Std. ein. Auf Grund von Isotopenversuchen nahm HELLMANN u.a. (1954) an, daß die menschl. NNR in 24 Std. ungefähr 30 mg Hydrocortison sezerniert.

Der Hormongehalt der NNR selbst ist also im Vergleich zu ihrer Sekretionsleistung gering. Sie gibt pro Minute rund das 10-fache ihres Hormongehaltes in das strömende Blut ab. Bei Durchströmung mit ACTH,

Kalium oder Adenosin-Triphosphorsäure (ATP) konnte man noch eine gewaltige Steigerung der Sekretion erreichen.

Das bedeutet, daß in der NNR kaum eine Speicherung von Hormonen stattfindet, und eine rasche Synthese abläuft.

Es ist heute auch experimentell bestätigt, daß die NN fähig ist, ihre Hormone selbst zu bilden.

BIOSYNTHESE DER NNR-HORMONE

Mit Hilfe von Durchströmungsversuchen an isolierten NN und Inkubation von NN-Schnitten oder -Homogenaten konnte der Syntheseverlauf *in vitro* nachgewiesen werden (HECHTER u.a. 1951) (PINCUS 1955). Offenbar spielen dabei enzymatisch gesteuerte Stoffwechselprodukte eine wesentliche Rolle.

Die Synthese geht vom aktiven Acetat aus und benützt zwei Wege. Der erste führt direkt zum Hormon. Auf ihn hat ACTH keinen Einfluß oder wirkt sogar hemmend. Der zweite geht über das Cholesterin (CURRAN, 1951). Dies scheint das Reservoir für die NNR-Hormone darzustellen, denn beim Erwachsenen kommt es (im Gegensatz zu den Befunden bei Neugeborenen), zu keiner nennenswerten Speicherung von Cst. Dagegen konnte man ein Absinken des Cholesteringehaltes der NNR nach Belastung beobachten. Mit C^{14} -markiertem Cholesterin gelang es, auch *in vivo* seine Beteiligung an der Hormonsynthese der NNR zu beweisen. Unter der Wirkung von ACTH kommt es zu einer Abspaltung der Cholesterinseitenkette und damit zur Bildung der Substanzen mit 21C-Atomen. Damit käme dem Δ^5 -Pregnen- 3β -ol-20on eine Schlüsselstellung zu, da die Oxydation der 3-OH-Gruppe zu Progesteron führt. Aus diesem können die Cst. durch weitere Oxydation hervorgehen. Die Reihenfolge der einzelnen Oxylierungen ist festgelegt. ACTH scheint nach der Bildung von Pregnenolon, bzw. Progesteron keinen Einfluß auf die weitere Cst-Synthese zu besitzen. Diese wird durch spezifische Fermentsysteme des intermediären Stoffwechsels gelenkt. Eine sogen. 3-Dehydrogenase₄ katalysiert die Umformung der Δ^5 ungesättigten 3-Oxysterioide zu Δ^4 -ungesättigten 3-Ketosterioide.

Diphosphopyridinnucleotid (DPN) ist dabei für alle Enzyme als spez. Wasserstoffakzeptor wirksam und führt zusammen mit ATP zu einer Beschleunigung und Steigerung des Umsatzes.

Weitere spez. Fermentsysteme befähigen die NNR zur stufenweisen Einführung von Sauerstoff an C17, dann C21 und schließlich C11. Die Oxylierung an C18 (Aldosteron) geht nach der an C21, aber noch vor der C11-Oxydation vor sich. Steroide mit einer 11-Oxygruppe werden nicht weiter umgewandelt.

KAHNT und WETTSTEIN (1951) beobachteten eine Wirkungssteigerung bei der C11-Oxylierung nach Zugabe von Säuren des Zitronensäurezyklus. Daneben wurden Nikotinamid, ATP und Ascorbinsäure benötigt. Nach ihrer Ansicht handelt es sich dabei um eine oxyd. Phosphorylierung, ähnlich der β -Oxylierung der Fettsäuren. Weitere Arbeiten über das Eingreifen von Ascorbinsäure bzw. Vit. C in die Oxylierungsvorgänge stammen von KERSTEN u.a. (1955) u. SCHMIDT u. STAUDINGER (1954), (1955). SELINGER (1955) wies auch auf die klin. Bedeutung der Stimulierung der Biosynthese durch Zugabe von Ascorbinsäure hin.

Die Steroide werden wahrscheinlich meist in freier Form in das Blut abgegeben. In der Leber geschieht dann die Koppelung der Cst. an Glucuronsäure oder Sulfate. Wahrscheinlich bedeutet das bereits den ersten Abbauschritt und die im Blut gefundenen gebundenen Cst. befinden sich bereits auf dem Weg zur Ausscheidung. HUDSON und LOMBARDO (1955) fanden jedoch im Nebennierenvenenblut auch Cst., die an Aminosäuren gebunden waren. Da an Eiweiß gebundene Cst. eine größere Wasserlöslichkeit besitzen, nimmt man an, daß diese Stoffe nur eine Transportform der Cst. im Blut darstellen. Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß es sich dabei um Zwischenprodukte der Synthese bzw. eine neue Hormongruppe handelt (SCHROEDER und VOIGT, 1956).

STOFFWECHSEL DER NNR-HORMONE

Der Austausch zwischen Blut und Gewebe erfolgt außerordentlich rasch. (LEVIN u.a. 1955). Auf welche Art die Cst. hier in die biologischen Vorgänge des Organismus eingreifen, ist noch nicht bekannt. Da ihr Aufenthalt im Blut nur kurz ist und der Gipfel der radioaktiven Ausscheidung ungefähr 2 Stunden nach der Infusion liegt (HELLMANN u.a. 1954), wird eine Speicherung in der Leber angenommen. Diese steht im Mittelpunkt des Steroidabbaues. Aber auch Niere und Milz sind zu Umwandlungen fähig.

Wahrscheinlich besitzen die einzelnen Steroide eine verschiedene Konjugations- und Eliminierungsgeschwindigkeit. Dies erklärt die große Variationsbreite in der Resorption von verschiedenen Hormonpräparaten (EIK - NES u.a. 1955). Nach anderen Versuchen mit radioaktiven markierten Cst. ist anzunehmen, daß ein Molekül ca. 3 Stunden braucht, bis es den Stoffwechselweg durchlaufen hat und ausgeschieden wird (SAMUELS, 1955). Beim Abbau der Cst. handelt es sich im wesentlichen um eine Reduktion der Ketogruppen und Doppelbindungen, wobei neue Assymetriezentren entstehen können.

Nach DORFMAN (1954), (1955) läuft der Abbauvorgang in bestimmter Reihenfolge ab:

Der erste Schritt ist die Hydrierung der Δ^4 -3-Ketogruppe zu einer gesättigten 3-Oxyform. Der Vorgang ist je nach Substrat sterisch gerichtet. So gehen die C21 Steroide mit Sauerstoff-Funktion an C11 fast ausschließlich in die 5/ β -Konfiguration über (Pregnan und Ätiocholan).

- 2.) Es kann eine Reduktion der 20-Ketogruppe oder
- 3.) der 21-OH-Gruppe erfolgen.
- 4.) Die Abspaltung der Ketolseitenkette erfolgt in jedem Fall erst nach der Hydrierung der 3-Ketogruppe. Es entsteht eine Carboxylgruppe, die durch Carboxylierung zu einer 17-Ketogruppe umgewandelt wird. Unter Einwirkung von Säuren des Zitronensäurecyclus erfolgt noch ein weiterer Abbau zu 17-Oxy-Steroiden.

5.) Eine Reduktion der 11-Keto- zur 11-Oxygruppe ist möglich, wie z.B. die Umwandlung von Cortison in Hydrocortison. Sogar eine Umwandlung von C19- zu C21-Steroiden ist nicht unwahrscheinlich (HECHTER 1953). Der Stoffwechsel der C21-Steroide ist daher eng mit dem der Androgenen (C19-Steroide) verknüpft.

Die Hauptabbauwege der aktiven Cst. (ROSENKILDE, SCHROEDER, 1956)

Cortison und Hydrocortison:

Die beiden Hormone können reversibel ineinander übergehen. Die wichtigsten Harnmetaboliten sind Tetrahydroverbindungen, (Reakt. 1) wie Pregnan-3 α , 17 α , 21-triol, 11, 20, -dion, bzw. Pregnan-3 α , 11 β , 17 α , 21-tetrol-20-on.

Außerdem entstehen in größeren Mengen 11-oxy-17-Ketosteroide (Ätiocholan-3 α -ol, 11, 17-dion, bzw. Ätiocholan-3 α , 11 β -diol, 17-on. (Reakt. 1 u. 4).

Corticosteron und 11-Dehydrocorticosteron:

können ebenfalls ineinander umgewandelt werden (Reakt. 5). In den Harn treten sie hauptsächlich als Pregnan-3 α , 20 α -diol, 11-on (Reakt. 1, 2, 3) und als Tetrahydroverbindungen über.

DOC:

bildet vor allem Pregnan-3 α , 20 α -diol. (Reakt. 1 u. 2).

17-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron:

wird überwiegend als Ätiocholan 3 α -ol, 17-on im Harn ausgeschieden (Reakt. 1 u. 4).

Über den Abbau des Aldosteron hat man noch nicht viel Erfahrungen. Wahrscheinlich wird es wie alle Cst. in der Hauptsache als Tetra- oder Hexa-Verbindung ausgeschieden.

Die Ausscheidung der Cst. erfolgt beim Menschen fast ausschließlich durch die Niere.

Nach BONGIOVANNI (1955) beträgt die Nierenclearance, verglichen mit der Kreatininclearance, für konjugierte Steroide 71%, für freie dagegen nur 11,2%.

DIE 17-KETOSTEROIDE

Bei dem Abbau der Cst. können aus 17-Oxy-Cst., durch Abspaltung der ω -Ketolseitenkette, 17-Ketosteroide (17KS) entstehen (Reakt.4). Dies sind Verbindungen mit 19C-Atomen und einer Ketogruppe an C17.

STAUDINGER u.a. (1954) vermuten, daß 10 - 20% des Cortison als 17KS, im Harn ausgeschieden werden. Den Hauptanteil, der im Harn befindlichen 17KS, machen aber die Metaboliten androgener Hormone aus Testis oder Ovar aus.

17KS, die sich von Cortison oder Hydrocortison herleiten, können durch ihre Oxylierung an C11 erkannt werden. Wenn keine 11-Oxygruppe mehr vorhanden ist, läßt sich nicht mehr entscheiden, ob das 17KS adrenaler Herkunft ist. Die Bestimmung der 17KS-Ausscheidung allein, läßt daher keine Rückschlüsse auf die NNR-Funktion zu.

Die wichtigsten 17KS sind Androsteron, Ätiocholanon und Dehydroepiandrosteron (DHEA).

DHEA ist das Hauptsteroid der β -Fraktion der 17KS und kommt sicher aus der NNR. LIEBERMANN und TEICH (1953) nehmen jedoch an, daß es sich dabei nicht um ein Abbauprodukt der Corticoide handelt, sondern um ein Metabolit intermediär auftretender Δ^5 -Verbindungen. In vermehrtem Maße konnte es bei malignen Neoplasmen nachgewiesen werden.

Im Harn wird es, ebenso wie die entsprechenden Cst. in der Hauptsache als Androsteron und Ätiocholanon ausgeschieden.

II. BESTIMMUNGSMETHODEN DER Cst.

Für die Klärung dieser Stoffwechselvorgänge, sowie der pathogenetischen Zusammenhänge und für die Beobachtung der Wirkung therapeutischer Eingriffe war eine Erfassung der Cst. und ihrer Metaboliten in den Körperflüssigkeiten unbedingt notwendig.

Die biologischen Bestimmungsmethoden erlauben nur begrenzte Einblicke und müssen schon wegen ihrer relativen Umständlichkeit, der langen Dauer und dem Kostenaufwand auf Forschungszwecke beschränkt bleiben.

Außerdem beruhen alle biolog. Testmethoden auf der Wirkung der verschiedenen Hormone im Organismus. Das bedeutet aber, daß nur ein kleiner Teil von ihnen, nämlich die biolog. wirksamen, freien Cst. gemessen werden. Der weitaus größere Teil, die an Säure gebundenen Cst., wird dabei vernachlässigt.

Der einfachste und gröbste Test ist der Überlebenstest (KUTZ, 1931) an adrenalectomierten Ratten (HARTMAN u. THORN, 1930) oder Hunden (HARROP u.a. 1931, SWINGLE 1954, GROSS u. GYSEL 1954).

Die Bedingungen können durch einen zusätzlichen Stress, z.B. Kälte, verschärft werden (HARTMAN u.a. 1931).

EVERSE u. DE FREMERY (1932) prüften die Adynamie nach kurzer Muskelreizung am Gastrocnemius von nebennierenlosen Ratten. - Der Test nach INGLE (1936) stellt einen kombinierten Arbeits- und Überlebenstest dar. - Zur Entdeckung und Analyse von Aldosteron hat besonders die Messung der Na-Retention beigetragen; (HARTMAN u.a. 1941, MARKUS u.a. 1952); ebenfalls die mittels Isotopentechnik vorgenommenen Untersuchungen des Verhältnisses von Na^{24} zu K^{42} im Harn. (SIMPSON u. TAIT, 1952).

Mit diesen Testen lassen sich vor allem die mineralaktiven Cst., Aldosteron und Cortexon, bestimmen. Dabei erwies sich Aldosteron als 25mal stärker auf die Na-Ausscheidung und 5mal mehr auf die

K-Ausscheidung wirksam, als Cortexon (DESAULLES u.a. 1953). Gemessen am Verhältnis Na/K war der Einfluß von reinem Aldosteron 100 - 120-mal größer (SIMPSON und TAIT, 1954, 1955; LUETSCHER und CURTIS, 1955; LLAURADO, 1956).

Die Wirkung der Glukocorticoide kann durch die Glykogenablagerung in der Leber adrenaletomierter Tiere sichtbar gemacht werden (REINECKE und KENDALL, 1943). Hiermit wird vor allem Hydrocortison gemessen, aber auch Corticosteron, Cortison und Aldosteron (SCHÜLLER u.a. 1954). VENNING, KAZMIN und BELL (1946) konnten mit diesem Test noch bis zu 10 μ g Cortison bei Mäusen bestimmen.

Als Normalwerte fanden sie:

0,040 - 0,085 mg/die bei gesunden Männern und

0,025 - 0,065 mg/die bei gesunden Frauen.

Schon früher waren HEARD, SOBEL und VENNING (1946) zu ähnlichen Ergebnissen gelangt. SPRECHLER (1951) konnte Normalwerte von 0,033 - 1,330 mg/die feststellen und FORBES u.a. (1950) erhielten 0 - 24 ME (= Mäuseeinheiten).

Außerdem kann der durch Cortison und ähnliche Substanzen bewirkte Abfall der eosinophilen Zellen im Blut gemessen werden (THORN-Test) (HILLS u.a. 1948) (SPEIRS u. MEYER, 1949). Aldosteron soll dabei, wenn auch nur halb so stark wie Cortison, ebenfalls wirksam sein (SPEIRS u.a. 1954). Mit dieser Methode bekam COPE u.a. (1951) Normalwerte von 0,040 - 0,120 mg/die.

Weiter wurden Teste, wie z.B. der Antiinsulintest und der Antientzündungstest angewandt.

Der Kliniker ist aber an schnellen, routinemäßig leicht durchführbaren und trotzdem spezifischen Methoden interessiert. Dazu sind eine Vielzahl von chemischen Bestimmungen in den am leichtesten zugänglichen Medien, Blut und Harn, ausgearbeitet worden. Diese Bestimmungen beruhen hauptsächlich auf chemischen Farbreaktionen der für die Cst. typischen Seitenketten. Die Konzentration der Cst. im Blut und Harn ist aber im Vergleich zu anderen Stoffen sehr gering und erreicht kaum die für eine colorimetrische Bestimmung nötige Dichte.

Die Schwierigkeiten ihrer Erfassung liegen also vor allem in der notwendigen Konzentrierung der Cst. und ihrer Trennung von anderen Stoffen. Für die Verwertbarkeit der Ergebnisse müssen daher sowohl bei Blut- wie Harnbestimmungen gewisse Voraussetzungen erfüllt werden (BORTH, 1957).

Da der Harn beim Menschen den Hauptausscheidungsweg der Steroidhormone darstellt, sind die in ihm gefundenen Mengen relativ groß und die Bestimmungen am einfachsten auszuführen. Durch das außerordentlich komplexe Stoffwechselgeschehen treten aber eine verwirrende Vielzahl von Metaboliten im Harn auf. Bis heute sind schon über 100 isoliert worden. Es ist dabei unmöglich, gewisse Metaboliten einem bestimmten Hormon zuzuordnen oder umgekehrt. Auch zwischen den Abbauprodukten von C21 Steroiden und C19 Steroiden gibt es keine scharfe Trennung. Allerdings ist eine grobe Unterscheidung durch einige Struktureigenschaften möglich. So sind Harnsteroidoide mit einer 11-Oxy- oder 11-Ketogruppe bestimmt adrenaler Herkunft.

Zur Bestimmung von Cst. im Harn ist das Sammeln von mindestens 24 Stundenurin zur Umgehung von Tagesschwankungen nötig. Um Stress-Situationen auszuschließen soll dies unter möglichst konstanten Bedingungen geschehen.

Da die Cst. nur wenig wasserlöslich sind, werden sie zu ihrer Ausscheidung im Harn in der Leber in eine gebundene und besser wasserlösliche Form überführt. So ist bei 90% der Harn-Cst. der Ring A am C3-Atom reduziert und entweder mit Glukuronsäure β -glycositisch oder mit Schwefelsäure esterartig gepaart. Weitere Konjugationen sind wahrscheinlich, aber noch nicht geklärt.

Zur Trennung der Cst. von Wasser und den ungewünschten wasserlöslichen organischen und anorganischen Substanzen ist eine Hydrolyse notwendig. Durch die Spaltung der Konjugierung wird der Lösungskoeffizient der Steroide zu Gunsten eines organischen Lösungsmittels verschoben, das dann zur Extraktion verwendet werden kann.

Während östrogene, phenolische St. und die meisten 17 KS durch Kochen mit starken Säuren erfolgreich von ihren Bindungen befreit werden, ist eine ideale Hydrolyse, d.h. eine vollständige Spaltung

ohne Veränderung der charakterischen Struktur, für die empfindlichen Cst. noch nicht erreicht. Jede Änderung der Reaktionsbedingungen, wie Temperatur, Säure und Art der anwesenden Ionen und Dauer der Hydrolyse beeinflusst die Resultate (LIEBERMAN u.a. 1954).

Säurehydrolyse bei erhöhten Temperaturen verursacht den meisten Schaden. Sie ist nur für den kleinen Teil der an Sulfat gebundenen Cst. geeignet. Die β , γ -ungesättigten Steroidsulfate werden dabei mehr zerstört, und verändert als die gesättigten. Es kann zu einer Sprengung des O-C-Bundes kommen und es entstehen Hydrolyseartefakte mit Doppelbindungen zwischen C2-C3 oder C3-C4.

Unter schwach sauren Bedingungen und erhöhten Temperaturen kann eine verhältnismäßig gute Hydrolyse von β , γ -ungesättigten 3-Sulfaten erzielt werden, während durch stark saure wässrige Lösungen 1/2 - 1/3 des DHEA zerstört werden (TALBOT 1943).

Optimale Bedingungen sind bei Zimmertemperatur und einem pH-Wert unter 1 gegeben (DOBRINER und LIEBERMAN, 1948). Dabei ist eine gleichzeitige Extraktion am besten mit Äther nötig. Es werden sowohl gesättigte, wie β , γ -ungesättigte Steroidsulfate wirksam hydrolysiert. Die S-O-Bindung wird unter Beibehaltung der Konfiguration des asymmetrischen C-Atoms gespalten.

Die meisten früher durchgeführten Cst-Untersuchungen basierten auf der pH1-Hydrolyse (HEARD und SOBEL, 1946; SPRECHLER 1950/51; LÖWENSTEIN 1946/48; DAUGHADAY 1948; ROMANOFF 1949).

Andere Autoren empfahlen ein Milieu von pH4 (TALBOT 1945). BUEHLER, KATZMAN und DOISY (1951) beschrieben ein Hydrolyseverfahren für Harnsteroiden bei pH = 0,7 (mit HCl) und kontinuierlicher Ätherextraktion, bei dem nicht nur Sulfate (Na-Androsteron-Sulfat bis zu 90%), sondern auch Glucuronide gespalten werden.

Schwefelsäure-Ester können ebenfalls mit 1,4 Dioxan oder einer Mischung von Dioxan und HCl (konz.) hydrolysiert werden. (COHEN und ONESSON 1953), (GRANT und BEALL 1950). Außerdem wurden Versuche mit Acetatpuffer (BITMAN und COHEN 1951) und Zugabe von Barium- oder Zinkchlorid beschrieben. 30-60% der Harn Cst. sind jedoch an Glucuronsäure gebunden (COHEN 1951). Für sie ist

eine Säurehydrolyse nicht geeignet, da es dabei zu Veränderung und Zerstörung der für die nachfolgende Bestimmung wichtigen Seitenketten kommen kann. Am besten hat sich die fermentative Hydrolyse mit β -Glucuronidase bewährt. (COHEN und MARRIAM 1951), (TALBOT u.a. 1943), (DUSTAN u.a. 1953).

Bestimmungen ohne Hydrolyse, also nur der freien Cst., wie sie früher üblich waren (TALBOT u.a. 1945) und für klinische Zwecke als ausreichend erachtet wurden, werden heute kaum mehr durchgeführt. Wenn man bedenkt, daß sowieso nur ein kleiner Teil der im Organismus vorhandenen Steroide durch die Niere ausgeschieden werden, so kann der winzige Teil der erfaßten freien Cst. (ca. 10 %) kaum verlässliche Anhaltspunkte geben.

Auch Methoden wie Lipoidextraktion und sogenannte Schnellextraktionen nach Ansäuerung sind nicht verlässlich genug und sollten durch wirksamere Techniken ersetzt werden. Dazu sind kombinierte Behandlungen, wie Säurehydrolyse der leichter spaltbaren Sulfate und enzymatische Behandlung der Glukuronide geeignet.

Für das Extraktions- und Reinigungsverfahren haben ebenfalls verschiedene Modifikationen Anwendung gefunden. Die Extraktion kann gleichzeitig mit der Hydrolyse im kontinuierlich arbeitenden Extraktionsapparat (18 bis 24 Std.) geschehen, wird aber meist erst im Anschluß durchgeführt. Als Extraktionsmittel wird vor allem Äther benützt. Er hat allerdings den Nachteil einer großen Feuergefährlichkeit, der leichten Emulgierfähigkeit und einer relativ großen Wasserlöslichkeit. Der Ätherverlust durch Verdunstung während der Arbeit oder durch Lösung im Harn kann bei geeigneter experimenteller Technik weitgehend vermieden werden. Der Verlust durch Emulsionsbildung kann ev. rechnerisch ausgeschaltet werden.

DINGEMANSE u.a. (1937), sowie TALBOT u.a. (1940) benützten daher Tetrachlorkohlenstoff und extrahierten gleichzeitig während der Hydrolyse.

Äthylendichlorid, das DREKTER u.a. 1952 verwendet hat, hat den Vorteil, nicht so feuergefährlich und schwerer wasserlöslich zu sein wie Äther (0,9 % : 7,2 %).

Die Emulsionsbildung kann durch eine Vorextraktion am besten mit Butanol im kontinuierlichen Extraktor (HERSHBERG und WOLF, 1940) umgangen werden, ohne daß dabei die 17 KS-Werte beeinflußt werden.

Da die Farbreaktionen meist nur Nebengruppen der Steroide benutzen, können sie auch nicht so spezifisch sein, wie Reaktionen, die das ganze Steroidmolekül erfassen (z.B. Infrarotspektroskopie). Man muß immer damit rechnen, daß andere Stoffe im Rohextrakt enthalten sind, die mit dem entsprechenden Reagenz ähnliche Reaktionen geben und so das Resultat verfälschen.

Es ist also noch eine weitgehende Reinigung und Fraktionierung der Cst., sowie eine Eliminierung der nichtspezifischen Chromogene vor der Colorimetrie nötig.

Eine Alkaliwäsche mit 2 n NaOH oder festen NaOH-Plättchen (DREKTER u.a. 1952) entfernt schon einen großen Teil der störenden Substanzen. Außerdem werden chemische Reinigungsverfahren, wie Adsorptionschromographie an Fluorisil- oder Silicagel-Säulen, verwendet.

Die neutrale Fraktion wird durch die Natronlauge und Nachspülen mit Wasser bis zur neutralen Reaktion von den sauren und phenolischen Anteilen getrennt.

Ein wertvolles Mittel zur weiteren Isolierung der ketonischen Steroide von der übrigen neutralen Fraktion ist das Girard-Reagenz T (Trimethylamino-acetohydrazidchlorid) (GIRARD, 1936). Es überführt die Ketone in wasserlösliche Hydrazone und ermöglicht so ihre Abtrennung von den wasserunlöslichen Nichtketonen.

Zur Elimination unspezifischer Chromogene, die sich bei der Farb-reaktion bilden und die optische Dichte bei der colorimetrischen Ablesung beeinflussen können, sind verschiedene mathematische Farbkorrekturen vorgeschlagen worden. Dazu wird eine zweite Ablesung vorgenommen in einer Wellenlänge, bei der die spezifische Absorption niedrig ist, die optische Dichte der störenden Chromogene dagegen als hoch angenommen wird (GIBSON und EVELYN, 1952).

Bei Gebrauch der ALLEN-Formel (1950) wird eine Korrektur der Farbwerte durch eine Ablesung in drei verschiedenen Wellenlängen erreicht.

Eine andere Methode besteht in der Bereitung von speziellen "blanks". Man versucht dabei, mit Hilfe eines Leerwertes die durch die unspezifischen Substanzen bedingte Farbe von der Gesamtreaktion abzugiehen. Die Kombination dieses Verfahrens mit den Korrekturformeln hat sich als besonders wertvoll erwiesen bei der Bestimmung der 17, 21-Dihydroxy-20-Ketosteroide mit der Methode nach REDDY(1952/54) (CRABBE und HERTOGHE, 1955).

METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER Cst. IM HARN

1. Steroide mit einer Dioxyacetonseitenkette besitzen reduzierende Eigenschaften. Diese wurden zuerst zur Bestimmung von Cst. ausgenützt.

TALBOT (1945) maß die Reduktion von Cu^{++} zu Cu^{+} -Ionen. Er bestimmte nur die freien Cst. Durch eine anschließende Girardtrennung erreichte er eine recht hohe Spezifität. Die Reduktion von Phosphormolybdat zu Molybdenblau bestimmten HEARD und SOBEL (1946). An der Reaktion beteiligt sich nicht nur die α -Ketolseitenkette, sondern auch die α , β -ungesättigte 3-Ketogruppe. Die Methode ist einfach aber nicht so spezifisch, da die 17-Oxy-, 11-Oxy- oder 11-Ketogruppen die Wirkung leicht abschwächen und auch andere nicht steroidale, reduzierende Substanzen die Reaktion beeinflussen können.

Eine Modifikation dieser Methode wurde von SPRECHLER (1950, 1951) angewandt. Er steigerte die Spezifität durch die Einschaltung einer Girardtrennung.

STAUDINGER und SCHMEISSER (1950) zerstörten vor der Behandlung mit Phosphormolybdat in einer Hälfte des Extraktes die reduzierenden Cst. durch verdünntes Alkali und Hitze. Dann wurden die beiden Teile colorimetrisch verglichen. Dieses Verfahren wurde von STAUDINGER und BAUER (1954) durch eine vorangehende Glucu-

ronidasespaltung weiter verbessert. CHEN u.a. (1953) entwickelte eine Methode, die auf der Reduktion von Tetrazoliumblau beruht. In alkalischer Lösung entsteht dabei ein stabiler Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 515 m μ .

2. Zur Erfassung der 17-Oxy-Cst. mit einer Dioxyacetonseitenkette haben PORTER und SILBER (1950) eine sehr brauchbare Methode angegeben, die auch viel zu Blutbestimmungen verwendet wird. Durch die Behandlung eines Cst.-haltigen Extraktes mit Phenylhydrazin und Schwefelsäure entsteht ein gelber Farbkomplex, der bei 410 m μ gemessen werden kann. REDDY, JENKINS und THORN (1952) vereinfachten die Methode, indem sie zur Umgehung der Hydrolyse eine Extraktion mit sorgfältig gereinigtem Butanol und eine geringere Schwefelsäure-Konzentration anwandten. Die Reaktion kann durch Hydrolyse mit Glukuronidase, Extraktion mit Chloroform und Ablesung gegen einen "blank"-Wert noch spezifischer gestaltet werden. Da Jodid stören kann, muß es durch gesättigtes Silbersulfat und Ansäuern auf pH1 entfernt werden.

Auch mit 1,4 Dinitrophenylhydrazin in alk. Lösung entsteht eine sehr empfindliche Farbreaktion (GORNALL und MAC DONALD, 1953). Die Ablesung erfolgt bei 475 m μ . Δ^4 -3-Ketone reagieren sehr schnell und können quantitativ erfaßt werden. Die C2O-Ketone werden durch Erhitzen zuerst in Dihydroxyketone umgewandelt.

3. Andere Bestimmungsmethoden beruhen auf der Oxydation der α -Ketol (oder α -Glycol-) Seitenkette mit Perjodsäure. Dabei wird pro Mol des Steroids ein Mol Formaldehyd abgespalten. LÖWENSTEIN, CORCORAN und PAGE (1946, 1948). Das dabei entstandene Formaldehyd bildet mit chromotroper Säure einen gelben Farbstoff.

Ähnlich gingen DAUGHADAY u.a. vor (1948). Nach einer Verteilung zwischen Benzol und Wasser wurde nur die wässrige Phase oxydiert. So erhielten sie ein recht spezifisches Resultat. Die etwas umständliche Destillation konnte mit der Conway'schen Diffusionskammer vereinfacht werden (BASSIL u.a. 1950, HOLLANDER u.a. 1951).

4. Entsprechend der formaldehydogenen Steroide können 17,20-Dioxy-21-methylsteroid mit Perjodsäure Acetaldehyd abspalten, der mit 4-Oxydiphenyl eine Farbreaktion gibt (COX, 1952).
5. NORBYN u.a. (1952, 1953) verwendete statt Perjodsäure Natriumwismutat und konnte damit auch die 17-Oxysteroid mit einer Dihydroxyacetonseitenkette zu 17-Ketosteroiden abbauen. Diese können dann mit der Farbreaktion nach ZIMMERMANN (1935/36) bestimmt werden. Von den so gefundenen Total-17KS werden die ohne Oxydation bestimmten 17KS abgezogen. Die Differenz ergibt dann die durch die Oxydation entstandenen sogen. 17-ketogenen-Steroide.
- APPLEBY u.a. (1955) erweiterte die Methode durch eine vorausgehende Reduktion der 17,20-Dioxy-21-methylsteroid mit Natriumborhydrid zu Dioxyacetonen, sodaß tatsächlich alle 17-Oxy-Cst. erfaßt werden können.

Cst. im Harn
Normalwerte bei Erwachsenen ^{†)}

Methode	Normalwerte (mg/24 Std)		Literatur
1	2	3	
	(männl.)	(weibl.)	
<u>Reduktion v.</u>	0,1 -0,38		TALBOT u.a.1945
<u>Cu-Salz</u>	0,1 -0,44		TALBOT u.a.1947
		0,21-1,19	ROMANOFF u.a.1949
	1,5 -2,25	0,8 -1,75	VOIGT u.a.1955
<u>Reduktion von Phos-</u>	1,1 -2,1	1,0 -2,0	HEARD u.d.1946
<u>phormolybdat</u>	0,62-0,8		STAUDINGER u.
		0,59-4,13	SCHMEISSER 1948
			ROMANOFF u.a.1949
	1,35-4,77	2,0	PARVIAINEN u.a.1950
	1,45-1,20	0,40-1,00	SPRECHLER 1951
<u>Oxydation zu</u>	0,50-0,80		LÖWENSTEIN u.a.1946
<u>Formaldehyd</u>	0,72-1,66	0,28-1,63	CORCORAN u. PAGE 1948
	1,4	0,56	CORCORAN u. PAGE 1950
	1,0 -1,6		DAUGHADAY u.a.1948
	1,5 -2,5		BASSIL u. HAIN 1950
	0,21-1,12		HOLLANDER u.a. 1951
	0,21-1,16	0,44-0,79	KING u. MASON 1950
	0,13-0,91	0,13-0,88	ROMANOFF u.a. 1949
<u>Oxydation zu Form-</u>	8,5 -21,2		VENNING 1951
<u>aldehyd nach</u>	21,0	15,0	DUSTAN u.a. 1953
<u>Glucuronidase-</u>			
<u>hydrolyse</u>			

Methode	Normalwerte (mg/24 Std)		Literatur
1	2	3	
	(männl.)	(weibl.)	
<u>Oxydation zu</u> <u>Acetaldehyd</u>	0,1 -0,5		COX 1952
<u>Reaktion mit</u>	0,1 -0,49	0 -0,86	CAROLL u.a. 1951
<u>Phenylhydrazin</u>	2,9 -12,0	1,1 -8,6	REDDY u.a. 1952
<u>(SILBER u. PORTER)</u>	3,0 -6,0		BAGGET u.a. 1952
<u>nach Glucuronida-</u>	3,3-9,3	2,1 -5,8	SANDBERG u.a. 1953
<u>sespaltung</u>	1,0 -8,0		VESTERGAARD 1953
	6,6		PORTER u. SILBER 1954
	5,0 -7,2	4,8 -6,8	RIVOIRE u.a. 1955
	5,4 -18,2	3,7 -13,7	CRABBE u. HERTOGHE 1955
<u>Oxydation zu</u>	9,6 -19,2	4,6 -13,4	NORYMBERSKI u.a. 1953
<u>17KS mit</u>	12,5		WOLFSON 1954
<u>Na Bi O₃</u>	11,1 -22,1	6,9 -17,9	DICZFALUSY u.a. 1955
<u>Oxydation zu</u>	22,4		APPLEBY u.a. 1954
<u>17KS nach</u>	23,1		APPLEBY u.a. 1954
<u>Borhydrid-</u> <u>reduktion</u>			

^{†)} Unter Benutzung einer Tabelle aus Diczfalusy, Birke u. Platin 1956.

Bisher festgestellte Normalwerte bei Kindern:

Redukt. von Phosphormolybdat:

2-7 Jhr.: 0,32-0,79 mg/die HEARD u.a. 1946

(HEARD, SOBEL u. Neugeborene: MATSON u. LONG-
VENNING) WELL (1949)

Frühgeburten: 0,17-0,38 mg/die

ausgetragen: 0,26-0,62 mg/die

(nach STAUDINGER Frühgeburten: 0,034-0,048 mg/die ZEISEL (1953)
und SCHMEISSER) ausgetragen: 0,1 -0,18 mg/die

1 Jahr: 0,23 mg/die

13-15 Jhr.: 0,89 mg/die

(nach STAUDINGER 0- 2 Jhr.: 0,5 mg/die BIERICH, BOHE u.
u. BAUER mit Glucu- 2- 4 Jhr.: 1,16 mg/die ZIMMERMANN, 1956
ronidasespaltung) 4- 6 Jhr.: 2,29 mg/die
6- 8 Jhr.: 2,79 mg/die
8-10 Jhr.: 3,66 mg/die
11-14 Jhr.: 5,23 mg/die
14-16 Jhr.: 5,64 mg/die

Oxydation zu Formaldehyd:

(DAUGHADAY u.a.) Neugeborene: 0,025-0,133 mg/die READ u.a. 1950

(CORCORAN u. PAGE) 0-15 Jhr.: 0,09 -0,85 mg/die KING u. MASON
(1950)

Porter-Silber-Reaktion:

Säuglinge: 0,021 mg/die SCHREIER u.a. 1952
(1 Wo-3 Mo)

4-14 Jhr.: 0,061 mg/die

Oxydation zu 17 KS:

6-11 Jhr.: 2,3-3,8 mg/die NORYMBERSKI
(1953)

BESTIMMUNGEN VON Cst. IM PERIPHEREN BLUT

Auch im peripheren Blut ist Hydrocortison das am meisten vorkommende Cst. Die gefundenen Mittelwerte zeigen eine gute Übereinstimmung. Umfangreiche Untersuchungen von BLISS u.a. (1953) ergaben, daß 95% aller Werte zwischen 3 - 26 $\mu\text{g}/100$ ccm Plasma liegen. Man muß berücksichtigen, daß die im Blut gefundenen Werte immer eine Resultierende aus Sekretions- und Eliminationsrate darstellen. Dadurch kann man einen Einblick in die Sekretionsdynamik der NNR gewinnen. Man sah dabei, daß größere Tagesschwankungen bestehen. Die höchsten Werte werden am Morgen (6 - 8 Uhr) gefunden (TYLER u.a. 1955). Im Laufe des Tages sinken sie langsam ab. Die größten intraindividuellen Schwankungen im Abstand von Tagen und Wochen betrugen nach BLISS 6 bis 22 $\mu\text{g}/100$ ccm Plasma. Untersuchungen der Verteilung der Cst. im peripheren Blut ergaben, daß sich 95% im Plasma befinden (BUSH 1953). Das Mengenverhältnis zwischen freien und glukurongebundenen Cst. ist ungefähr gleich (BONGIOVANNI u.a. 1955).

Die Prinzipien der Bestimmung sind die gleichen wie bei Harnuntersuchungen. Methoden, die mit wenig Material auskommen, sind am besten geeignet.

Hauptsächlich werden Bestimmungen angewandt, die auf der Phenylhydrazin-Schwefelsäure-Färbung nach PORTEN und SILBER beruhen (NELSON u. SAMUEL 1952).

Auch hier entscheiden technische Fragen wie die Extraktion und Reinigung über die Spezifität der Methode.

Eine Übersicht über die gebräuchlichsten Blutbestimmungsmethoden findet sich bei J. TAMM (1956).

SPEZIELLE BESTIMMUNGSMETHODEN DER Cst.

Außer diesen chemischen Gruppenbestimmungen, gibt es heute eine Reihe von chem. und physik. Verfahren, die es erlauben, eine Charakterisierung einzelner Stoffe vorzunehmen. Diese Methoden sind für wissenschaftliche Fragestellungen außerordentlich wichtig und interessant. Für Routineuntersuchungen beanspruchen sie jedoch noch einen zu großen Arbeits- und Zeitaufwand.

Eine weitgehende Fraktionierung kann man mit Hilfe der Säulenchromatographie erreichen.

Man verwendet sie vor allem bei Plasma-Cst-Bestimmungen. Als Adsorbens dienen dabei Al-Oxyd, Silikatgel, Zinkchlorid oder Zellose.

Die Papierchromatographie (BURTON, ZAFFARONI und KENTMAN 1951) ermöglicht eine genaue Trennung der freien Cst. Ähnlich wie bei Eiweißstoffen ist auch bei der Papierelektrophorese der Cst. eine Charakterisierung durch den elektr. Strom möglich (VOIGT u. a. 1955).

Eine charakteristische Farbfluorescenz geben α , β ungesättigte 3-Ketosteroide im UV-Licht (Absorpt. bei 240 m) nach Besprühen mit Phosphor oder Schwefelsäure (NEHER u. a. 1948).

Spezielle Farbreaktionen wurden auch für Cortison, Aldosteron usw. ausgearbeitet (NEHER u. WETTSTEIN 1951). Außerdem können die einzelnen Cst. auch mit Infrarotspektroskopie (JONES u. DOBRINER 1949), sowie mit den üblichen chemischen Analysemethoden (Elementaranalyse, Schmelzpunktbestimmung usw.) erkannt und gemessen werden.

III. DIE BESTIMMUNG DER 17 KGS

WAHL DER METHODE

Für die klinische Routineuntersuchung der Cst. bei Kindern zwingt schon die niedere Konzentration der im Blut vorhandenen Cst. zu einer Bevorzugung von Harnbestimmungsmethoden. Das Sammeln von 24 Stunden-Urinen ist zwar etwas umständlich und verlangt ein verlässlich arbeitendes Pflegepersonal, ist aber für Kinder doch eine schonendere Maßnahme als die Blutabnahme.

Um sich schnell über den Cst.-Spiegel nach therapeut. Gaben von Hormonen zu informieren, scheinen Kurzmethode, wie die nach REDDY, ausreichend zu sein.

Die exakte Methode der Papierchromatographie jedoch muß wegen ihrer relativen Langwierigkeit für spezielle Fragestellungen vorbehalten bleiben.

Von den Gruppenbestimmungsmethoden ist die Bestimmung der 17-KGS nach NORYMBERSKI, STUBBS und WEST(1953) besonders geeignet, da:

1. durch die Umwandlung der Cst. mit Natriumwismutat zu den stabileren 17 KS die Schwierigkeit der Hydrolyse am besten umgangen wird;
2. die Bestimmung der 17 KS nach ZIMMERMANN (1935) eine verlässliche und erprobte Methode ist, die nachweislich steroides Material mißt;
3. mit diesem Verfahren 3 von 6 bekannten Cst-Seitenketten erfaßt werden können. Nämlich fast alle 17-OH-Cst., die einen Hauptanteil der Urin-Cst ausmachen. 17-Desoxy-Cst. z.B. Cortexon können mit dieser Bestimmung nicht gemessen werden;
4. liegen die gefundenen Normalwerte höher als die bisher mit anderen Gruppenbestimmungen festgestellten Werte. Es kann also angenommen werden, daß sie tatsächlich ein Maß für die Funktion der NNR darstellen.

5. hat diese Methode den Vorteil einer relativ schnellen und einfachen Ausführbarkeit, sodaß sie routinemäßig in jedem klinischen Labor vorgenommen werden kann.

ENTWICKLUNG DER METHODE

Die Oxydation der Cst. mit Perjodsäure wurde schon bei der Aufklärung ihrer Struktur von REICHSTEIN und SHOPPE 1943 angewandt. Man konnte damit eine schonende Spaltung von 21-Desoxy-17-Glykolen und 21-Hydroxy-17,20 Glykolen erzielen.

Ihre indirekte Bestimmung durch Messung der entstehenden 17-KS mit der Farbreaktion nach ZIMMERMANN wurde zuerst von TALBOT und EITINGTON 1944 und FIESER, FIELDS und LIEBERMANN 1944 beschrieben. Die Bestimmung von formaldehydbildenden und acetaldehydbildenden Steroiden nach Perjodsäure Oxydation wurde schon erwähnt.

Mit weniger Erfolg wurde das Bleitetraacetat als Oxydationsmittel verwendet. Man erkannte aber, daß auch 3-wertiges Silber und Natriumwismutat die physikalischen Voraussetzungen besitzen, Glykole auf dieselbe Art zu spalten. Besonders Natriumwismutat erwies sich als wirksam, auch Äthylen-Glykol milde zu spalten. Die Beobachtung, daß Natriumwismutat im Gegensatz zur Perjodsäure auch α -Hydroxysäuren spaltet, wurde dann von NORZYMBERSKI zur Charakterisierung der wichtigen Cst. Gruppe mit Dihydroxy-Acetonseitenkette ausgenützt. Während Perjodsäure diese nur zu α -Hydroxysäure oxydiert, wird sie durch Natriumwismutat ebenfalls zu 17 KS umgewandelt.

1952 beschrieb NORZYMBERSKI zuerst eine Bestimmungsmethode für Cst. im Urin, die auf ihrer Oxydation mit Natriumwismutat zu 17 KS beruht. Von den so gefundenen "Total-17-KS" werden die ohne vorherige Oxydation bestimmten 17 KS abgezogen. Die Differenz ergibt dann, die durch die Oxydation gespaltenen sogn. 17 KGS. Das Ergebnis der auf diese Art bestimmten Cst. kam ungefähr dem Betrag der formaldehydbildenden Steroide nach Enzymhydrolyse gleich. Durch Zugabe von verschiedenen Cst. zum Urin erreichte er dabei eine deutliche Zunahme der 17 KGS, während die Wirkung auf die 17 KS ganz gering war.

SPEZIFITÄT DER METHODE

Um zu beweisen, daß die Umwandlung zu 17 KS durch eine spezifische und voraussagbare Reaktion geschieht, untersuchte BROOKS und NORBYERSKI (1953) 7 Substanzen mit typischen Cst.-Seitenketten nach präparativer Oxydation mit Natriumwismutat. Dabei wurden die formaldehydogenen Steroide (20-21 Glykole und 20-21 Ketole z.B. DOC) in die entsprechenden Substanzen konvertiert, während Cst. mit 17,20 Glykol, 17, 20, 21 Triol-Seitenketten und die beiden Dihydroxyacetone Cortison und Hydrocortison wie erhofft zu 17 KS umgewandelt wurden. Nur die Substanz mit einer 17-20 Ketolgruppe blieb unverändert. Trotz des verwendeten großen Überschusses an Oxydationsmittel wurde keine Wirkung an den Kernsubstituenten beobachtet. Um das Ausmaß der Oxydation festzustellen, wurden die freigesetzten Substanzen sowohl als Formaldehyd mit der chromotropen Säure und als 17 KS mit Dinitrobenzol bestimmt und auf der analytischen Waage gemessen. Dabei wurde auch eine mengenmäßig gute Umwandlungsrate festgestellt, z.B. konnten DOC und Cortison quantitativ als Formaldehyd bzw. 17 KS wieder gefunden werden. Um die Resultate der ZIMMERMANN-Reaktion sicher schätzen zu können, wurden Bestimmungen der Farbäquivalente des Ausgangsmaterials und der erwarteten Produkte durchgeführt. Dieselbe Methode wurde auch bei einem Urinextrakt angewandt. Vor der Bestimmung der 17 KS fand man dabei eine Girardtrennung notwendig. Zum Urin gegebene 17 α , 20 β , 21-Trihydroxypregnen-3-on wurde in guter Menge wiedergefunden.

Bei Urinbestimmungen nach Cortisongaben beobachteten NORBYERSKI u.a. 1953, daß die Wiederauffindung des Cortisons als 17 KGS (ausgedrückt in mg/DHEA pro mg Cortisonacetat), rund 40% beträgt. Die klare Abhängigkeit zwischen Dosis und 17 KGS Spiegel zeigte sich auch in einer linearen Beziehung zwischen gegebenen Cortisonacetat und Menge der ausgeschiedenen 17 KGS.

Daraus läßt sich schließen, daß die Bestimmung der 17 KGS ein Maß für NNR-Tätigkeit, genauer für die Produktion von 17 α -Hydroxy-Cst. darstellt.

Da die 21-Desoxy, 17,20-Ketole als einzige 17-Hydroxy-Cst. von NaBiO_3 nicht angegriffen werden, erweiterte APPLEBY u.a. (1955) die Methode durch eine Borhydridreduktion vor der Oxydation. Dadurch werden die 17,20-Ketole in 17-20 Glukole umgewandelt und können als solche ebenfalls zu 17 KS gespalten werden. Auf diese Weise werden wirklich alle 17-OH-Cst. bestimmt. Es hat sich aber gezeigt, daß die Miterfassung der 21-Desoxy-17,20-Ketole bei normalen Personen keine wesentliche Erhöhung der Ausscheidungswerte gibt. (Mittelwerte nach APPLEBY; 17 KGS 22, 4 mg/die; gesamt 17-OH-Cst. 23, 1 mg/die).

Dagegen erhielt er z.B. bei adreno-genitalen Syndrom deutlich höhere Werte.

EINFLUSS DER VERSCHIEDENEN EXPERIMENTELLEN BEDINGUNGEN

Die wichtigsten Schritte zur Bestimmung der 17 KGS sind: Ansäuerung mit Eisessig, Oxydation mit Natriumwismutat, darauf folgend Hydrolyse, Extraktion u. colorimetr. Bestimmung.

Jede Variation dieser Bedingungen kann zu Unterschieden in den Ergebnissen führen. DICZFALUSY (1955) überprüfte die von NORYM-BERSKI (1953) angegebene Methode unter den verschiedenen Versuchsbedingungen und verglich die gefundenen Werte nach chromatographischer Trennung.

So sah er, daß man durch das Ansäuern des Urins mit 50% Eisessig allein nur einen ganz geringen Betrag von 17 KS erhält.

Durch die Oxydation mit Natriumwismutat werden dagegen schon ein Teil der an Glucuronsäure gebundenen 17 KGS frei und es kommt zu einem bedeutenden Anstieg der 17 KS. Darunter konnten Androsteron und Ätiocholanon durch ihr Infrarotspektrum erkannt werden. Den größten Anteil stellten aber die 11-Oxysterioide, vor allem das 11-Ketoätiocholanolon, das ebenfalls durch Infrarotspektrographie nachgewiesen werden konnte. Dies unterstützt die Auffassung, daß Tetrahydrocortison, das Haupt-Cst-Metabolit im Urin ist.

Während NORYMBERSKI u.a. (1953) für 8 ml Urin und 8 ml Eisessig 2 g NaBiO_3 als Oxydationsmittel und eine Reaktionszeit von 30 Min. für ausreichend hielten, verwendete DICZFALUSY (1955) zu der gleichen Urinmenge 3 g NaBiO_3 und verlängerte die Oxydationszeit auf 24 Std. Dadurch konnte er eine wesentlich höhere Ausbeute an ZIMMERMANN-Chromogenen erreichen. Um sicher zu sein, daß dieser Anstieg wirklich auf einem größeren Betrag der freigesetzten 17 KGS beruht oder nur auf einer Vermehrung von nicht steroiden, farbgebenden Substanzen, führte er ebenfalls eine chromatographische Trennung der erhaltenen Extrakte durch. Er stellte dabei fest, daß der absolute Betrag der 11-Oxy-Steroide durch die verlängerte Oxydationszeit erheblich ansteigt. Das bedeutet, daß dadurch mehr 17 KGS gespalten werden. Und zwar beruhte die Zunahme vor allem auf einer vermehrten Anwesenheit von 11-Keto-St. gegenüber 11-Hydroxyst. Er schließt daraus, daß die 11-Hydroxy-Cst leichter oxydiert werden als die entsprechenden 11-Ketokomponenten. Die Prüfung mit verschiedenen Konzentrationen von Eisessig ergab, daß reine 17 KGS schon bei 1-5% Eisessig umgewandelt werden, während bei den Urin-Cst. höhere Konzentrationen angewendet werden müssen. Wahrscheinlich werden durch die große Menge von NaBiO_3 , die bei der Oxydation im Urin notwendig ist, auch mehr Steroide an der Oberfläche des Reagenz absorbiert. So fand man bei Verwendung von 10 % Eisessig 60 %, bei 50 % Eisessig ca. 90 % DHEA wieder (NORYMBERSKI u.a., 1953).

Da NaBiO_3 fast unlöslich ist, läßt sich der Überschuß durch Zentrifugieren leicht abtrennen. Reste des Oxydationsmittels können durch Zugabe von Natriumbisulfit reduziert werden. Dadurch wird die Wiederauffindung von Cst., die zum Urin gegeben wurden, verbessert.

Um einen Verlust von Cst. durch die Absorption an überschüssigem NaBiO_3 ganz auszuschalten, versuchte SCHILD (1954), den Niederschlag mitzuerfassen. Dies ließ sich durch Verwendung einer größeren Menge von Natriumbisulfit zur Reduktion und Zugabe von Salzsäure zur Auflösung des reduzierten Niederschlages erreichen. Dadurch wird das Zentrifugieren überflüssig und der Arbeitsgang vereinfacht. Nach Angaben von SCHILD konnte er mit dieser Modifikation tatsächlich eine Erhöhung der Resultate erzielen. Eigene Versuche mit

dieser Methode konnten dies jedoch nicht bestätigen. Wichtig ist außerdem, daß das Ausschütteln mit NaBiO_3 unter Lichtabschluß vorgenommen wird. Anscheinend beeinflußt das Licht eine Zwischenreaktion von Wismutat und wässrigem Eisessig und führt so zu unregelmäßigen Ergebnissen.

Von Bedeutung ist auch der Ausschluß von Glucose. Dies geschieht zum Teil schon durch die Verwendung eines Überschusses an NaBiO_3 . Bei Anwesenheit von größeren Mengen von Glucose im Urin werden jedoch die Ergebnisse stark vermindert.

Die Notwendigkeit einer anschließenden Hydrolyse wurde ebenfalls von DICZFALUSY in verschiedenen Versuchsreihen deutlich gemacht. Da ja ein erheblicher Betrag der Urin-Cst. auch als Sulfat oder in anderweitiger Bindung vorliegt, steigt nach der Hydrolyse nicht nur der Betrag an DHEA, sondern auch der 11-Oxy, 17-Ketosteroide noch weiter an. Für die Extraktion mit Äther oder Äthylenchlorid, die Reinigung und Fraktionierung der 17 KS gelten dieselben Bedingungen, wie bei den anderen Bestimmungsmethoden von Urin-Cst.

COLORIMETRIE

Durch die oxydative Umwandlung der 17 KGS zu 17 KS ist es möglich geworden, diese mit der von ZIMMERMANN (1936) angegebenen Farbreaktion mit Dinitrobenzol kolorimetrisch zu messen. Diese Reaktion erfaßt alle Verbindungen mit einer CO-CH_2 -Konfiguration, also außer 17 KS auch 20 KS u. α - β -ungesättigte 3 KS. Da die 17 KS aber die größte Farbintensität aufweisen, ist es gerade für sie ein recht spezifischer Nachweis. Reine 17 KS, wie man sie nach Keton-Fraktionierung mit Girard-Reagenz erhält, geben mit m-DNB in Gegenwart von starkem Alkali eine stabile violette Farbe, mit einem Absorptionsmaximum bei 520 m μ .

Allerdings variiert auch die Reaktionsstärke der einzelnen 17 KS untereinander (WILSON 1954). So weisen z.B. DHEA und Androsteron bei dem von ZIMMERMANN vorgeschriebenen Ansatz mit wässriger Alkalilauge verschiedene Reaktionsgeschwindigkeiten auf. Dadurch wird zwar nicht die Spezifität der Methode, aber ihre quantitative Auswertung etwas eingeschränkt. 3-KS und Verbindungen mit einer Methylketogruppe geben nur eine labile Farbreaktion, die bald ins Gelbbraune übergeht. Da diese Farbkomplexe alkali-empfindlich sind, können sie durch die Verwendung einer mindestens 2 n-Alkalikonzentration ausgeschaltet werden. Außerdem ist die Reaktion noch abhängig von der Konzentration des m-DNB (o-oder p-DNB geben diese Reaktion nicht), vom Lösungsmittel der 17 KS, von Temperatur, Zeit und Belichtung.

Bei Anwendung dieser Methode auf die neutrale Fraktion eines Harn-extraktes entsteht ein Farbgemisch mit violett bis gelbbraunem Ton. Es sind also Chromogene dabei, welche die aus den 17-KS entstandene Farbe überlagern.

Da eine Girardtrennung bei Routinebestimmungen zu umständlich ist, hat ZIMMERMANN 2 verschiedene, verhältnismäßig einfachere Methoden zur Ausschaltung dieser Chromogene angegeben (ZIMMERMANN, Anton und PONTIUS, 1952).

Die erste beruht auf einer rechnerischen Korrektur. Dazu ist eine doppelte Messung der Extinktionen, einmal im Absorptionsmaximum der gesuchten Verbindung (530 m μ) und einmal im Maximum der störenden Farbe notwendig.

Voraussetzung ist natürlich, daß beide Komponenten im gewählten Spektralbereich eine möglichst verschiedene Absorption aufweisen und ihre Einzelfarben sich nicht addieren. Dies ist der Fall bei Messung der 17 KS mit einem grünen (S53) und der auszuschaltenden Farbstoffe mit einem violetten (S42) Filter.

Die Korrektur erfolgt dann mit Hilfe der VIERRORDTschen Gleichung und die gesuchte Konzentration (in mg Androsteron ausgedrückt) beträgt:

$$\text{Konz. Androst.} = A \cdot E_{\text{grün}} - B \cdot E_{\text{violett}}$$

Die spez. Extinktionskoeffizienten (A = Androsteron, B = störendes Chromogen) sind temperaturabhängig. Als Störsubstanz im Harn wurde zuerst Kreatinin angenommen. Die dafür errechneten Extinktionskoeffizienten betragen A = 31, B = 5, bei einer Entwicklungstemperatur von 25°.

Später wurde erkannt, daß es sich bei den Störsubstanzen mehr um 3-KS handelt. Vergleiche mit durch Girard-Reinigung gefundenen Zahlen zeigen, daß Extinktionsverhältniskurven für Androst.-Testost.-Gemische besser stimmen, als bei Androst.-Kreatininmischungen.

Die korrigierte Formel lautet dann:

$$\text{mg\% Konz. Androst. (25}^{\circ}\text{)} = 52 \cdot \text{Ext.}_{\text{grün}} - 28 \cdot \text{Ext.}_{\text{violett}}$$

Andere Abwandlungen der VIERROTHschen Gleichung von GIBSON und EVELYN (1952) und FRASER u.a. (1941) wurden vor allem in der anglo-amerik.-Literatur zur rechn. Korrektur angewandt. Eine weitere empirisch gefundene Formel wurde von ALLEN u.a. (1950) angegeben. Vergleichsversuche (ZIMMERMANN, ANTON u. PONTIUS, 1952) ergaben eine weitgehende Übereinstimmung der Formeln von GIBSON und ZIMMERMANN!

Die Korrektur von ALLEN scheint zu einschneidend zu sein und ergibt bedeutend niedrigere Werte.

Untersuchungen der 17 KS nach chromatograph. Trennung (SPIEGELHOF u.a. 1955) zeigten, daß bei der rechn. Eliminierung mit der ZIMMERMANN- oder FRASER-Formel die Korrektur vor allem in der Fraktion 3, die im wesentlichen aus 3β -17 KS (DHEA u. Isoandrosteron) besteht, nicht ausreicht. Diese weisen eine starke Eigenfarbe auf, enthalten also die meisten Chromogene.

Die übrige Mehrzahl der Chromogeneluat sind praktisch chromogenfrei, sodaß dann auch reine 17 KS von der Korrektur betroffen werden. Es kommt also bei der rechn. Ausschaltung der Störfaktoren zu einer Überhöhung der Werte der 3β -17KS, in den übrigen Fraktionen aber zu einer Senkung der Werte unter den tatsächlichen Hormongehalt.

Da aber die 3β -17-KS den NNR-Anteil des Gesamtkomplexes darstellen, kann dies zu falschen Schlüssen in der Bewertung Anlaß geben.

Die zweite Art der Reinigung versucht daher, die rechn. Ausschaltung durch eine Äther- oder Chloroform-Extraktion des Farbkomplexes zu umgehen. Die spez. aus den 17 KS entstandenen Farbstoffe gehen dabei in die Äther- bzw. Chloroformschicht und können von der wässrigen Phase, welche die störenden Chromogene enthält, getrennt und durch Filtration geklärt werden.

Die anschließende Messung braucht nur mit einem Filter im Absorptionsbereich von 490 - 500 m μ zu geschehen; muß aber schnell erfolgen, da die Farbstoffe lichtempfindlich sind. Die Menge der enthaltenen 17 KS kann dann in einer aufgestellten Androsteron-Eichkurve abgelesen werden und daraus die Literkonzentration bzw. Tagesausscheidung berechnet werden. Die so gefundenen Werte sind fast ebenso genau, wie die, welche man nach Reinigung über Girard-Verbindungen bekommt. Ätherextrakte der kristall. Substanzen und auf diese Weise behandelte Harnextrakte besitzen weitgehend ähnliche Extinktionskurven. DHEA und Androsteron wurden fast vollständig wiedergefunden (SPIEGELHOFF, 1955).

Allerdings liegen die gefundenen Werte stets unter den mit der Korrekturformel errechneten. ZIMMERMANN u.a. (1952) fanden bei Vergleichsmessungen mit der Ätherextraktion 100 %, mit Chloroform 95 % und mit der rechn. Methode 195 % der erwarteten Menge an 17 KS. Bei Annahme, daß die durch Girard-Reinigung gewonnene Konzentration an 17 KS 100 % beträgt, erhielten sie:

bei Ätherextraktion	102 %
bei Chloroformextraktion	99 %
mit der ZIMMERMANN-Formel	170 %
nach GIBSON und EVELYN	166 %
nach ALLEN	112 %

Immerhin konnten sie aber feststellen, daß man durch die rechnerische Bestimmung gleiche Schwankungen, d.h. gleiche Maxima und Minima erhält, nur mit überhöhten Werten. Sie stellt also keine wirkliche quantitative Messung der 17 KS dar, sondern gibt nur Vergleichswerte. Da sie aber besonders bei Routineuntersuchungen relativ einfach auszuführen ist, wurde sie vor allem in Deutschland zu 17 KS Bestimmungen vielfach verwendet und scheint auch für klinische Zwecke ausreichend zu sein.

Dagegen wurde in anderen Ländern die Modifikation der ZIMMERMANN-Reaktion nach CALLOW (1938) am meisten angewandt. Er arbeitet mit absolut alkohol. Lösungen. Dadurch kommt es zu einer Verminderung der gelbbraunen Farbtöne. Auch DHEA und Androsteron gleichen sich in der Reaktionsgeschwindigkeit mehr an. Interferierende Chromogene müssen auch dabei noch rechn. eliminiert werden.

Der Nachteil dieser Methode liegt in der schlechten Haltbarkeit der Lösung von Kalilauge in absolut. Alkohol. Durch Zusatz von Ascorbinsäure (HAMBURGER, 1952) kann diese stabilisiert werden.

Weniger durchgesetzt hat sich die Modifikation der Methode von HOLTORFF und KOCH (1940), der das Untersuchungsmaterial in 95 % Alkohol löst und dann mit 95 % alkohol. m-DNB und 5n wässriger Kalilauge arbeitet. Er führte vorher noch eine Girard-Trennung durch.

Auch bei der Bestimmung der 17 KGS nach Wismutatoxydation muß man demnach erwarten, daß die Wahl der Colorimetriemethode die

Ergebnisse beeinflusst. Tatsächlich zeigten vergleichende Versuche, daß die durch die Methode bedingten Unterschiede bei den 17 KGS noch erheblicher und unregelmäßiger sind als bei den 17 KS.

BROOKS und NORBYMERSKI (1953) beobachteten mit der CALLOW-Methode eine Variationsbreite der gefundenen 17 KS von 65 - 130 (relativ zu DHEA = 100).

Bei den meisten bisher durchgeführten Bestimmungen der 17 KGS wurde mit dem Ansatz nach CALLOW, in absolut. alkohol. Natronlauge gearbeitet.

(NORBYMERSKI, 1953; DICZFALUSY, 1955; SCHÜLLER, 1956).

Außerdem fanden Abwandlungen der CALLOW-Methode, wie die Mikromethode nach HAMBURGER (1952) oder VESTERGAARD (1951), Verwendung (BORTH u.a. 1957).

In Deutschland wurde zum Teil auch für die 17 KGS-Bestimmung der für die 17 KS übliche Ansatz in wässriger Natronlauge nach ZIMMERMANN beibehalten und eine Ausschüttelung mit Chloroform oder Äther vorgenommen (SCHILD, 1954; LAROS, 1955; BREUER und NOCKE, 1957).

In der hiesigen Klinik wurde nun versucht, die 17 KGS auch mit der einfachen 2-Filtermethode (n. ZIMMERMANN) zu bestimmen.

Doppelversuche mit Chloroformausschüttelung bestätigen, daß die rechnerisch gefundenen Werte stets höher liegen. Während die Erhöhung bei den 17 KS aber nur gering war, ergab die 2-Filtermethode bei den 17 KGS weit höhere Werte. Es scheint also, daß bei der 2-Filtermethode Substanzen miterfaßt werden, die erst durch die Oxydation entstanden sind und nicht in die Chloroformlösung übertreten.

Wie klinische, anderweitig publizierte Versuche gezeigt haben, besteht die Möglichkeit, daß es sich dabei ebenfalls um Ausscheidungsprodukte der NNR handelt. So können z.B. auch die 20- oder 3-Ketosteroide mitreagieren und bei einer Gruppenbestimmung, wie sie die 17 KGS-Bestimmung darstellt, ruhig mit einbezogen werden.

Gerade mit der 2-Filtermethode fand man bei bestimmten Erkrankungen der NNR (z.B. adrenogenit. Syndrom) außerordentlich erhöhte

Werte. Wie nachgewiesen werden konnte, geht diese Erhöhung hauptsächlich auf 11-Desoxyverbindungen zurück. Man vermutet daher, daß die bei dieser Erkrankung vermehrten patholog. Vorstufen von Cortison und Hydrocortison besonders ausgiebig miterfaßt werden.

Bei der Bewertung muß somit berücksichtigt werden, daß es sich bei den gefundenen Beträgen nicht um eine quantitative Erfassung gewisser Cst. handelt, sondern ähnlich wie bei der 17 KS Bestimmung mit der 2-Filtermethode um überhöhte Werte, die jedoch mit den Schwankungen der NNR-Produktion im Zusammenhang stehen.

Um nun eine Auswertung der in der Klinik durchgeführten Bestimmungen bei pathol. Fällen zu ermöglichen, sind in dieser Arbeit Urin-Untersuchungen an nebennierengesunden Kindern ausgeführt worden. Beabsichtigt wurde auch mit der sogn. "2-Filtermethode" die Schwankungsbreiten festzustellen und eine Abgrenzung von Normalwerten zu schaffen gegenüber Ergebnissen, die als pathologisch anzusehen sind.

Vergleichsuntersuchungen mit den zwei in Frage kommenden anderen Methoden (der Chloroformausschüttelung und CALLOW-Methode) sind zur Zeit noch in Bearbeitung.

IV. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

METHODIK UND MATERIAL

Zur Durchführung der Untersuchungen wurde das Verfahren von NORYMBERSKI u.a. (1953) benutzt, mit den von DICZFALUSY (1955) angegebenen Verbesserungen. Nur die Ausgangsmengen wurden etwas vergrößert. Um Tagesschwankungen in der Literkonzentration der ausgeschiedenen Hormone zu vermeiden, ist die Gesamtharnmenge eines Kindes während 24 Std. gesammelt worden.

Durch Zugabe einer geringen Menge Salzsäure läßt sich eine bakterielle Zersetzung verhindern. Soweit die Urinproben nicht gleich frisch verarbeitet werden konnten, wurden sie im Kühlschrank aufbewahrt. Der Gehalt an 17 KS scheint sich, auch bei längerer Aufbewahrung nicht zu verändern. Dagegen sind die Corticoide nicht so beständig.

Die Bestimmung der 17 KS wird mit einer Ausgangsmenge von 50 ccm Urin ausgeführt. Nach Zusatz von 1,5 ccm rauchender Salzsäure erfolgt die Hydrolyse durch 15 Min. Kochen im Wasserbad. Hierauf werden die Gläser zur Abkühlung in Eiswasser gestellt. Sind sie ganz erkaltet, wird ihr Inhalt in die Kolben der Schüttelmaschine umgeleert. Diese faßt 8 senkrecht stehende Scheidetrichter, die mit offenen Aufsätzen versehen sind. Auf diese Weise können immer 8 Bestimmungen gleichzeitig durchgeführt werden.

Die Urinproben werden zuerst mit 50 ccm und dann mit 25 ccm Äther 1 - 2 Min. durchgeschüttelt. Um einwandfreie Ergebnisse zu erhalten, ist die Verwendung von aldehydfreiem Äther ratsam. Die abgesetzte wässrige Phase wird jeweils abgelassen. Die beiden Ätherextrakte werden vereinigt und 2mal mit 25 ccm 10% Natronlauge gereinigt. Meist ist bei der 17-KS-Bestimmung noch eine Reinigung mit gesättigter Sodalösung angebracht.

Dann wird mit Aqua dest. bis zur Neutralisation nachgespült. Der nun klare gelblich oder violett gefärbte Ätherextrakt wird im Vakuum (mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe) bei Zimmertemperatur eingedampft.

Die 17 KS bleiben als trockene Substanz am Boden des Gläschens zurück. Zur Colorimetrie werden sie in 5 ccm abs. Alkohol gelöst.

Zu jeder Bestimmung werden 2 Reagenzgläser mit je 1,5 ccm des alkohol. Harnextraktes und 1,5 ccm 3n wässriger Kalilauge angesetzt.

Dann wird zur Ausführung der Farbreaktion in eines der Gläser 1,5 ccm 2% m-Dinitrobenzol (in unvergälltem absoluten Alkohol gelöst) gegeben. Im zweiten Glas wird es durch 1,5 ccm absolut. Alkohol ersetzt. So erhält man einen Vergleichswert zur Ausschaltung der Eigenfarbe des Harnextraktes. In jeder Versuchsreihe werden gleichzeitig die Reagenzienleerwerte mitbestimmt und gegen Alkohol abgelesen.

Sofort nach dem Ansetzen kommen die verschlossenen Reagenzgläser in das Wasserbad des Thermostaten. Bei einer konstanten Temperatur von $25^{\circ} (\pm 0,1^{\circ})$ bleiben sie dort genau 60 Min. Vor direktem Licht sollen sie dabei geschützt werden.

Zur gleichzeitigen Ausführung von mehreren Bestimmungen erwies es sich am zweckmäßigsten, die Harnextrakte nacheinander (alle 2-3 Min.) zur Farbreaktion anzusetzen und die Gläser in derselben Reihenfolge wieder herauszunehmen. Die beiden Ansätze werden dann sofort in das elektrische Colorimeter gebracht.

Nach der von ZIMMERMANN zur Bestimmung der 17 KS angegebenen 2-Filtermethode werden die entstandenen Farbwerte zuerst mit einem grünen (S 53) und dann mit einem violetten (S 42) Filter gegeneinander abgelesen. Ebenso werden die Reagenzienleerwerte gemessen und von den Extinktionen der Harnextraktfarben abgezogen. Die Leerwerte schwankten zwischen 0,25 - 0,30 (S 53) und 0,55 - 0,62 (S 42).

Aus den so gefundenen Extinktionen werden die enthaltenen 17 KS nach der Formel:

$$\text{mg\% Konz.} = 52 \cdot \text{Ext.}_{53} - 28 \cdot \text{Ext.}_{42}$$

berechnet (s. Abschnitt: Colorimetrie).

Da die in der ursprünglichen Urinmenge von 50 ccm enthaltenen 17 KS in nur 5 ccm Alkohol gelöst werden, liegt ein Konzentrationsverhältnis von 1 : 10 vor. Die errechneten Werte entsprechen also der in einem Liter Urin enthaltenen 17 KS-Konzentration, ausgedrückt in mg DHEA.

Zur Bestimmung der 17 KGS wurden 30 ccm Urin verwendet. Nach Zugabe von 30 ccm Eisessig und 5 g Natriumwismutat wird eine Stunde im Dunkeln geschüttelt. Die Proben bleiben 18 - 24 Std. unter Lichtabschluß stehen und werden dann zentrifugiert. Von der überstehenden wässrigen Phase werden 25 ccm abpipettiert und zur vollständigen Reduktion des noch gelösten NaBiO_3 mit 1,5 ccm Natriumbisulfit (3%) versetzt. Das Ganze wird mit Aqua dest. auf 50 ccm aufgefüllt und in gleicher Weise wie die 17 KS hydrolysiert, extrahiert und colorimetriert.

Die aufgeführten Normalwerte der 17 KGS sind durchwegs mit der 2-Filtermethode gewonnen.

Bei der Berechnung muß berücksichtigt werden, daß die untersuchte Urinmenge (12,5 ccm) nur 1/4 der bei der 17 KS verarbeiteten Menge beträgt.

Die Ergebnisse wurden in mg DHEA ausgedrückt, da in sämtlichen anderen Arbeiten dieses KS als Eichsubstanz bei Wiederauffindungsversuchen benutzt wurde.

In unserem Labor wurde durch Überprüfung der Methode mit Reinsubstanzen (DHEA, Androsteron, Testosteron, 5β -Pregnan $3\alpha, 17\alpha$ -diol, 20-on) gefunden, daß die von ZIMMERMANN für eine Androsteronkonzentration aufgestellte Formel auf DHEA am besten zutrifft. Selbst ausgeführte Bestimmungen von Androsteron in alkohol. Lösung ergaben mit der 2-Filtermethode einen konstanten Fehler von - 20%.

Nimmt man dagegen DHEA als Eichsubstanz, wie es fast täglich im Labor der Kinderklinik zur Überprüfung der Colorimetrie geschieht, so erhält man eine Fehlergrenze von $\pm 5\%$.

Die als Gesamt-17-KGS bezeichneten Ergebniswerte umfassen nicht nur die durch die Oxydation neugebildeten 17 KS, sondern auch die normalerweise im Urin enthaltenen 17 KS.

Erst die Differenz beider ergibt also die Menge der oxydierten ketogenen Substanzen, d.h. jener Hormone und ihrer Metaboliten, welche man bestimmt als Produkte der NNR ansehen kann. Bei den Kindern ist die 17 - KS-Sekretion bereits gut bekannt und im Vergleich zu den Gesamt-17 KGS deutlich geringer.

Weiter darf man annehmen, daß bei den Kindern die Hormonsekretion von Hoden bzw. Ovar noch nicht so ins Gesicht fällt und die gefundenen 17 KS auch zum Teil von der NNR stammen können. Es wurden deshalb die gefundenen Werte als Gesamt-17 KGS angegeben. Die reinen 17 KS-Werte sind eigens aufgeführt (Tab. 1 und 2).

Die 17 KGS-Ausscheidung im Urin wurde bei über 100 Kindern geprüft. Zur Einarbeitung in die Methode wurden so lange Doppelversuche ausgeführt, bis sich eine gute Übereinstimmung zeigte.

Die Absicht, Normalwerte von Kindern zu ermitteln, konnte allerdings nur mit einer gewissen Einschränkung ausgeführt werden. Die Schwierigkeit lag darin, Urin von "normalen" Kindern zu bekommen.

Die Versuche, von Heimkindern Urine zu erhalten, scheiterten daran, daß es sehr umständlich ist, bei Kindern, bes. bei Schulkindern, die genaue Tagesurinmenge zu sammeln. Da gerade die Bestimmung der Tagesausscheidung von Bedeutung ist, war dieses Material zu unzuverlässig.

Die untersuchten Urine stammen also fast durchwegs von Kindern, die sich zu dieser Zeit in der Klinik befanden. Es wurden dabei nur Kinder gewählt, die bereits als geheilt anzusehen waren und von deren Krankheiten man annehmen konnte, daß sie in keinem Zusammenhang mit der NNR stehen.

Bei der Empfindlichkeit der NNR-Sekretion gegen Stress-Situationen jeglicher Art muß aber zumindest berücksichtigt werden, daß die Kinder sich außerhalb ihrer gewohnten Umgebung und Lebensumstände befanden. Außerdem kann die überstandene Krankheit, sowie therap. Maßnahmen, auch wenn sie nicht im ursächlichen Zusammenhang mit der NNR stehen, doch eine Veränderung der Hormonsekretion nach sich ziehen.

Arbeiten von ZEISEL und STRÖDER (1954) und LANGENBACH (1955) haben gezeigt, daß bei den verschiedensten krankhaften Zuständen (Infektionskrankheiten, Ernährungsstörungen usw.) bei Kindern immer auch eine Beteiligung der NNR nachzuweisen und im Sinne des Adaptionsyndroms von SELYE (1951) zu erklären ist. Es besagt im wesentlichen, daß der Organismus auf einen Stress mit einem unspezifischen Abwehrvorgang antwortet, indem er durch eine Mehrsekretion von ACTH eine gesteigerte Ausschüttung von NNR-Hormonen, bes. der Gluco-Cst. hervorruft (Alarmreaktion).

Bei länger dauernder Erkrankung paßt sich die NNR durch Hypertrophie der vermehrten Belastung an (Resistenzstadium), bis sie schließlich, bei zu lange anhaltender akuter Belastung in ein Stadium der Erschöpfung eintritt und die Hormonsekretion abfällt.

Diese Faktoren beeinflussen natürlich die Einheitlichkeit des untersuchten Materials und bedingen eine größere Schwankungsbreite. Es ist also besser, die Ergebnisse dieser Arbeit nicht als Normalwerte zu bezeichnen, sondern von den Ausscheidungswerten nebennierengesunder Kinder zu sprechen. Da jedoch in der Klinik die 17 KGS-Bestimmung meist nur bei stationären Patienten ausgeführt wird, sind gerade diese Ergebnisse von Interesse.

Weiter soll hier gleich der Ausfall an Meßwerten bei Säuglingen von 6 - 12 Monaten entschuldigt werden, da es uns in diesem Altersabschnitt nicht möglich war, Tagesurin mengenmäßig genau zu sammeln.

ERGEBNISSE

Die Tabellen 1 und 2 geben eine Übersicht über die bei Kindern und Säuglingen festgestellte Literkonzentration und Tagesausscheidung der 17 KS und Gesamt 17 KGS im Urin. Zur Erklärung der auftretenden Schwankungen wurden die Diagnosen soweit wie möglich mit angeführt. So zeigt sich z.B., daß Kinder mit cerebralen Anfällen zu einer etwas höheren Ausscheidung der Gesamt 17 KGS neigen.

ERKLÄRUNG DER KURVEN

(Gruppeneinteilung und statistische Auswertung)

Die Ergebnisse der 17 KS-Ausscheidung sind in den Abbildungen 1 - 3, die der Gesamt-17-KGS in den Abbildungen 4 - 6 dargestellt.

Auf der Abszisse ist das Alter der Kinder, auf der Ordinate sind die 17 KS, bzw. Gesamt 17 KGS-Werte, ausgedrückt in mg DHEA, angegeben.

Die in Tab. 1 und 2 aufgeführten Meß-Werte sind als kleine Kreise in den Abbildungen eingetragen.

Da sich die Meßwerte nicht gleichmäßig auf jede Altersstufe verteilen, wurde eine Zusammenfassung in Klassen vorgenommen. Damit wurde es möglich, die Ergebnisse einheitlicher und übersichtlicher darzustellen.

Diese Gruppen umfassen bei den Säuglingen das 1. Quartal und das restliche Säuglingsalter.

Bei den Kindern erstrecken sie sich

- vom 1. bis einschließlich 3.,
- vom 4. bis einschließlich 6.,
- vom 7. bis einschließlich 9.,
- vom 10. bis einschließlich 14. Lebensjahr.

Somit fallen die Klassenmitten auf den 2. und 7 1/2 Monat, bzw. auf das 2., 5., 8., und 12. Jahr. Sie sind in den Kurven durch senkrechte Linien markiert. Auf diesen sind die in Tabelle 3 zusammengefaßten errechneten Werte abzulesen. Als Grundlage der statist. Auswertung wurde das arithmetische Mittel $\bar{x}_m$ der verschiedenen Gruppen gewählt. Diese ergaben die Mittelwertskurven ($\bar{x}_m$).

Da das untersuchte Material verhältnismäßig klein ist, muß mit einem größeren Bereich von "zufälligen" Schwankungen gerechnet werden. Die Kenntnis dieses Bereichs ist eine unbedingte Voraussetzung für die richtige Beurteilung statist. Zahlen (KOLLER, 1953). Mit Hilfe der Prüfverfahren der math. Statistik versucht man daher, aus wenigen Stichproben einen Aufschluß zu erhalten über die Gesamtheit aller jener Ergebnisse, die man unter den gleichen Versuchsbedingungen erhalten würde. Zu diesem Zweck wurde der Vertrauensbereich des Mittelwertes $\bar{x}_m$ bestimmt. Man grenzt damit mit einer bestimmten statist. Sicherheit den Fehlerbereich ab, innerhalb welchem der gefundene Mittelwert von dem wahren Mittelwert der Gesamtheit aller möglichen Ergebnisse abweicht.

Unter Zugrundelegung der errechenbaren mittl. quadr. Abweichung (s) (s . unten!) ergibt sich ein Vertrauensbereich des Mittelwertes von

$$\bar{x}_m \pm t \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Er wurde in den Kurven für eine stat. Sicherheit von 95% angegeben. Der Faktor t ist abhängig von der Anzahl der Stichproben n , (bzw. dem Freiheitsgrad $N = n - 1$) und der gewünschten stat. Sicherheit. Zur Feststellung des Wertes kann man sich vorhandener Tabellen bedienen LINDER, 1953; GRAF und HENNING, 1953; (t -Verteilung nach STUDENT).

Zur Feststellung, wie sehr die gemessenen Einzelwerte (x_i) um den Mittelwert ($\bar{x}_m$) streuen, wurde die mittlere quadratische Abweichung (s) berechnet.

$$s^2 = \pm \frac{1}{n-1} \cdot \sum (x_i - \bar{x}_m)^2$$

Durch die Quadrierung ergibt dieses Streuungsmaß eine möglichst große Genauigkeit. Es wird in den Abbildungen durch die Kurven $x_m \pm s$ dargestellt.

Durch die Division der absoluten Werte der mittl. quadr. Abweichung (s) durch das arithmet. Mittel (x_m) erhält man ein relatives Streuungsmaß, den Variationskoeffizienten:

$$V = \frac{s/x_m}{x_m} \cdot 100\%$$

Er wird in Prozenten angegeben und ermöglicht einen Vergleich der gefundenen Streuungen untereinander, da z.B. Vergrößerungen der Werte, die durch die höhere Ausscheidung der älteren Kinder bedingt sind, ausgeschaltet werden. Die verhältnismäßig große Streubreite, welche sich bei den Untersuchungen ergab, beruht nicht nur auf den Fehlern der Methode. Hauptsächlich umfaßt sie die physiologischen Schwankungen in der Hormonausscheidung verschiedener Kinder einzelner Altersstufen. Zu den individuellen Schwankungen gesellen sich noch Unterschiede in der Entwicklung und der Einfluß vorausgegangener Krankheiten der Kinder.

Diese Ungleichheit des Materials schränkt auch die Brauchbarkeit einer statistischen Auswertung ein.

UNTERSUCHUNG DER 17 KS (Abb. 1a/b, 2 u. 3)

Bei insgesamt 88 Kindern fanden sich Schwankungsgrößen in der 17 KS-Ausscheidung

bei den Säuglingen von 0,3 - 2,9 mg/l und

0,1 - 1,1 mg/die,

bei den Kindern von 0,2 - 6,1 mg/l und

0,1 - 6,1 mg/die

(s. Tab. 1 und 2).

Es zeigt sich, daß bei den Kindern die Streuung sowohl in der Literkonzentration, wie in der Tagesausscheidung der 17 KS sehr erheblich ist. Mittlere quadrat. Abweichung und Variationskoeffizienten sind

meist sehr groß. Dabei muß aber berücksichtigt werden, daß die geringe Anzahl der Fälle in manchen Altersgruppen eine wesentliche Zunahme der Schwankungsbreite bedingt.

Immerhin ergibt die Tagesausscheidung einheitlichere Werte und gestattet somit, eine gewisse Altersnorm innerhalb der einzelnen Gruppen abzugrenzen.

Die Jahresmittelwerte, auf Abb. 3 durch eine gepunktete Linie angedeutet, schwanken ziemlich stark. Sie verlaufen aber doch zum größten Teil innerhalb der Vertrauensgrenze der Gruppenmittelwerte.

Im ganzen gesehen läßt sich eine deutliche Zunahme der 17-KS-Ausscheidung mit dem Alter der Kinder erkennen. Dieselbe Beobachtung wurde bereits mehrfach von anderer Seite berichtet. Eine ganz ähnliche Kurve wurde von ZEISEL und PRESSLER 1953 aufgestellt. Allerdings sind die von uns gefundenen Werte etwas niedriger. Dies ist umso auffälliger, da wir für die 17-KS-Bestimmung eine Methode verwenden, die nach ZIMMERMANN u.a. (1952) wesentlich höhere Werte ergibt. Eine signifikante Erhöhung in der Pupertätsperiode läßt sich nicht erkennen, da die Versuche nur Kinder bis zu 14 Jahren umfassen.

Bei den Säuglingen zeigt die Literkonzentration, wie die Tagesausscheidung der 17 KS in den ersten Lebensmonaten eine abfallende Tendenz. Dies entspricht auch den Beobachtungen von ZEISEL und PRESSLER (1953).

Die höhere 17-KS-Ausscheidung bei Neugeborenen und in den ersten Wochen stimmt mit den anatom. histol. Substrat überein. Zu dieser Zeit ist die NN verhältnismäßig groß und vor allem die Zona reticularis verbreitert. Erst im Laufe der Zeit bildet sich die NN zur normalen Größe zurück. Es wird vermutet, daß es sich dabei um einen physiolog. Hypercortizismus handelt, der durch die mütterlichen gonadotropen Hormone oder Placentarhormone verursacht wird (ZEISEL und PRESSLER, 1953).

Leider lassen die wenigen Werte im restlichen Säuglingsalter keine weitere Aussage zu. Der Ausfall der Werte wurde in der Kurve durch Extrapolation überbrückt.

UNTERSUCHUNG DER GESAMT-17-KGS

Es wurden die Meßergebnisse von 95 Kindern verwertet. Die ermittelten Werte sind in Abb. 4., 5. und 6. dargestellt. Die gefundenen Werte schwanken

bei den Säuglingen von	1,2 - 17,1 mg/l und
	0,5 - 3,7 mg/die
bei den Kindern (1-14 Jhr.) v.	4,0 - 27,3 mg/l und
	1,1 - 21,6 mg/die

Bei den Säuglingen läßt sich, ähnlich der 17 KS-Ausscheidung, ein leichter Abfall im ersten Halbjahr feststellen. Für das restliche Säuglingsalter fehlen leider die Werte. Der Anschluß an die Kurve der Kinder wurde daher durch Extrapolation ermittelt.

Die einfache Angabe der Schwankungsbreite bei den Kindern kann durch die ungefähre Übereinstimmung von Literkonzentration und Tagesausscheidung leicht irreführen. Vergleicht man jedoch die Kurven der mittl. quadrat. Abweichung, so wird deutlich, wieviel größer die Streuungsbreite der Literkonzentration ist, als die der Gesamtausscheidung im Laufe eines Tages. Aus den Abbildungen ist weiterhin klar zu erkennen, daß es sich bei 17 KGS mg/l um Schwankungen handelt, die bereits innerhalb derselben Altersstufe vorkommen, während die Werte sich bei den 17 KGS mg/die auf die 14 Jahre gleichmäßig steigend verteilen.

Die Kurven der Gruppenmittelwerte ($\bar{x}_m$) beweisen, daß die Tagesausscheidung der 17 KGS mit zunehmendem Alter fast linear ansteigt. Die Literkonzentration der 17 KGS im Urin dagegen läßt keine Altersabhängigkeit erkennen.

Die Prüfung der Vertrauensgrenzen der Gruppenmittelwerte ($\bar{x}_m \pm t \frac{s}{\sqrt{n}}$) hat gezeigt, daß die einzelnen Jahresmittelwerte (gepunktete Linie Abb. 6) die Sicherheitsschwellen für 95% nicht überschreiten. Womit die Gruppeneinteilung einigermaßen gerechtfertigt erscheint.

Bei der Literkonzentration wurde von einer Berechnung der Jahresmittelwerte, infolge der großen Streuungsbreite abgesehen.

Da die Literkonzentration keine eindeutige Mehrsekretion mit zunehmendem Alter erkennen läßt, scheint der Anstieg der Tagesausscheidung echt zu sein und nicht nur durch die größer werdende Urinmenge bedingt. Erst wenn sich die Tagesurinmenge bis zu einem Liter steigert, stimmen die Kurven wieder besser überein.

Das bedeutet, daß erst unter Berücksichtigung der Tagesurinmenge ein wirkliches Bild der Sekretionsgröße zustande kommt. Dann allerdings läßt sich ein bestimmtes Ausscheidungsmaß für jede Altersstufe oder zumindest Altersgruppe abgrenzen. Das Kind scheidet also, unabhängig von der Größe der Urinmenge, im Tage eine ganz bestimmte, seinem Alter entsprechende Cst.-Menge aus.

Da sie je nach Urinmenge einmal in verdünnter, einmal in konzentrierter Form eliminiert werden, scheint eine von verschiedenen Autoren angenommene Nierenclearance keine große Bedeutung zu besitzen (BONGIOVANNI, 1955). Da aber andererseits die meisten Störsubstanzen und Verunreinigungen proportional der Urinmenge zunehmen, läßt die konstante Ausscheidung der gemessenen Stoffe vermuten, daß es sich dabei um Sekretionsprodukte handelt, die von anderen Faktoren abhängig sind.

In wie weit nun wirklich das Alter der Kinder oder, wie von anderer Seite behauptet, die Zunahme an Größe und Gewicht für den Anstieg der 17 KGS verantwortlich ist, muß dahingestellt bleiben. Für eine solche Auffassung spricht jedoch, daß kleinwüchsige Kinder eine verhältnismäßig niedrigere Sekretion aufweisen.

Zum Schluß soll nochmals darauf hingewiesen werden, daß die angegebenen mg wohl nicht der tatsächlich ausgeschiedenen Steroidmenge entsprechen, sondern nur überhöhte Vergleichswerte darstellen.

Tab.: 1

Meßergebnisse bei Säuglingen

No.	Alter Mon.	17 - KS		17 - KGS		Bemerkungen
		mg/Liter	mg/die	mg/Liter	mg/die	
1	2	3	4	5	6	7
1	1	1,3	0,7	8,7	3,7	Erythroblastose
2	1	0,8	0,2	6,8	1,7	2 Tage nach Infekt
			0,4		2,7	Monatsmittelwert
1	2	0,4	0,1	8,5	1,9	Z.n. Pneumonie
2	2	0,4	0,1	10,4	1,9	spast. Bronchitis
3	2	1,9	0,3	-	-	Dyspepsie
4	2	1,3	0,6	5,4	2,5	Pylorusstenose
5	2	2,9	1,1	10,7	3,2	fraglich
6	2	0,8	0,2	6,0	1,8	Pylorusstenose
7	2	1,6	0,6	4,0	1,6	Pylorusstenose
8	2	0,8	0,2	13,7	2,7	Dyspepsie
9	2	-	-	4,0	0,8	Dyspepsie
10	2	1,1	0,3	11,5	3,5	Heimkind
11	2	0,9	0,2	10,5	2,3	Hauterkrankung
			0,4		2,2	Monatsmittelwert
1	3	1,1	0,4	5,6	2,2	Dyspepsie
2	3	-	-	5,8	2,3	Heimkind
3	3	0,7	0,1	16,1	1,9	fraglich
4	3	0,4	0,1	17,1	3,4	fraglich
5	3	0,5	0,1	8,2	1,7	Dyspepsie
			0,2		2,3	Monatsmittelwert
1	4	0,3	0,1	9,8	2,0	Z.n. Fieber
2a	4	0,6	0,2	6,0	1,8	Z.h. Pneumonie
2b	4	1,3	0,3	8,0	2,0	Z.n. Pneumonie
3	4	0,5	0,2	5,8	1,8	Heimkind
			0,2		1,9	Monatsmittelwert
1	5	0,3	0,1	4,0	0,7	Z.n. Fieber

Tab. 1

Meßergebnisse bei Säuglingen

Blatt 2

No.	Alter Mon.	17 - KS		17 - KGS		Bemerkungen
		mg/Liter	mg/die	mg/Liter	mg/die	
1	2	3	4	5	6	7
1	6	0,7	0,3	1,2	0,5	Z.B. Ruhr
2	6	0,4	0,1	4,8	1,2	multipl. Mißbildungen
			0,2		0,9	Monatsmittelwert
1	7	0,4	0,1	4,0	0,6	Z.n. Pneumonie
-	8	-	-	-	-	
1	9	1,7	0,7	4,0	1,6	Z.n. Pneumonie
-	10	-	-	-	-	
-	11	-	-	-	-	

No.	Ge- schl.	Alter Jahre	17 - KS		17 - KGS		Bemerkungen
			mg/Liter	mg/die	mg/Liter	mg/die	
1	2	3	4	5	6	7	8
1	m	1	1,0	0,5	12,8	6,4	Z.n. Pneumonie
2	m	1	0,3	0,1	7,3	2,2	gesund
3	m	1	0,9	0,4	14,5	5,8	Z.n. Stomatitis
4	m	1	0,7	0,2	3,7	1,1	chron. Zystitis, Megaurether
				0,3		3,9	Jahresmittelwert
1	m	2	0,7	0,2	20,6	5,2	Aortenstenose
2	m	2	0,9	0,5	13,0	3,9	Z.n. seröser Meningitis
				0,4		4,5	Jahresmittelwert
1	m	3	5,2	1,6	-	-	Palatum fissum
2	m	3	0,9	0,4	12,5	6,2	cerebrale Anfälle
3	m	3	-	-	15,0	5,0	Heimkind
				1,0		5,6	Jahresmittelwert
1	w	4	4,0	1,4	20,8	7,3	chron. Encephalitis
2	m	4	1,1	1,0	5,8	5,5	Z.n. Enteritis
3	w	4	2,4	1,2	7,2	3,6	Z.n. Poliomyelitis
4	w	4	3,0	1,5	10,0	5,0	exog. Fettsucht
5	m	4	1,6	0,8	24,0	9,0	Vitium cordis
6	w	4	1,5	0,9	17,6	10,5	Nabelkoliken
7	m	4	-	-	14,2	6,4	Heimkind
8	m	4	0,7	0,4	13,1	7,8	Heimkind
9	w	4	0,2	0,1	14,8	7,4	Heimkind
10	m	4	0,4	0,2	12,8	6,0	Heimkind
				0,8		6,9	Jahresmittelwert
1	m	5	0,8	0,3	11,4	4,5	cerebr. Anfälle
2	m	5	1,0	0,5	16,0	8,0	Kleinwuchs, hyperchrome Anämie
3	w	5	0,5	0,3	9,6	5,1	Heimkind
				0,4		5,9	Jahresmittelwert

Tab.: 2

Meßergebnisse bei Kindern

Blatt 2

No.	Ge- schl.	Alter Jahre	17 - KS		17 - KGS		Bemerkungen
			mg/Liter	mg/die	mg/Liter	mg/die	
1	2	3	4	5	6	7	8
1	w	6	1,3	0,7	8,2	4,1	Kleinwuchs
2	m	6	6,1	2,4	7,6	3,0	Z.n.Grippe-Croup
3	m	6	1,5	0,8	7,6	4,0	Heimkind
4	m	6	1,4	0,6	27,3	12,3	Heimkind
5	m	6	1,0	0,9	4,0	3,7	Z.n.Meningitis tuberc.
6	w	6	0,9	0,5	14,0	8,5	Z.n.Nephritis u. T.E.
7	w	6	2,8	1,8	12,0	7,8	cerebrale Anfälle
				1,1		6,2	Jahresmittelwert
1	m	7	3,3	2,6	7,2	5,8	Z.n.Poliomyelitis
2	m	7	3,6	2,5	15,3	10,7	Pseudohepatoiridismus
3	w	7	1,7	0,8	8,0	3,0	Bindegewebs-Schwächling
4	w	7	-	-	12,0	9,0	cerebr. Anfälle
5	w	7	0,3	0,2	14,0	9,8	gesund (Neuropathie)
6	m	7	1,4	1,4	14,0	14,0	Vitium cordis
7	m	7	1,0	0,9	12,2	11,2	Obstipation
				1,4		9,0	Jahresmittelwert
1	w	8	1,3	0,8	13,8	8,3	Heimkind
2	w	8	1,2	0,8	22,2	13,3	Heimkind
3	w	8	1,5	0,8	27,5	13,8	Heimkind
4	w	8	1,6	1,4*	6,2	5,6	Entwicklungsstörungen
5	m	8	1,3	1,5	8,6	9,4	Z.n.Hepatitis epidemica
6	w	8	3,3	1,6	30,0	15,0	Fettsucht
7	m	8	2,0	1,2	14,6	8,8	Heimkind
8	m	8	-	-	12,2	11,2	Obstipation
				1,2		10,7	Jahresmittelwert
1	w	9	-	-	9,3	9,3	vor 1 Monat Herzoperation
2	w	9	1,3	1,2	8,0	6,7	Choreaminor
3	m	9	5,2	3,2	24,0	15,5	cerebr. Anfälle
4	m	9	1,1	1,3	6,5	7,8	Z.n.Nephritis
5	m	9	-	-	9,6	10,5	Z.n.Pyelitis
				1,9		10,0	Jahresmittelwert

Tab.: 2

Meßergebnisse bei Kindern

Blatt 3

No.	Ge- schl.	Alter Jahre	17 - KS		17 - KGS		Bemerkungen
			mg/Liter	mg/die	mg/Liter	mg/die	
1	2	3	4	5	6	7	8
1	m	10	1,8	2,2	12,3	14,8	Z.n.leichter Hepatitis
2a	m	10	-	-	20,2	15,1	Asthma Bronch.
2b	m	10	-	-	24,8	12,4	Z.n.Tonsillektomie
3	w	10	3,2	3,5	13,0	14,3	Pyelitis
4	m	10	3,0	2,7	8,6	7,7	Nephritis
5	m	10	2,5	2,2	15,4	13,1	Ulcus ventriculi
				2,6		12,8	Jahresmittelwert
1	m	11	0,6	0,5	9,4	8,0	Psychog. Anfälle
2	w	11	4,1	3,9	-	-	Z.n.fieberhaft. Infekt
3	m	11	2,6	3,6	13,1	13,4	cerebr.-Anfälle
4	m	11	3,0	2,4	17,2	13,8	Z.n.Pyelitis
5	m	11	3,0	1,2	-	-	vor 1 Mon. Herzoperation
				2,3		13,4	Jahresmittelwert
1	w	12	3,7	2,6	25,2	19,2	incl. Muskelatrophie
2	m	12	1,8	2,3	12,0	15,0	Z.n.Hepatitis epidem.
3	m	12	-	-	14,7	17,6	Hepatitis
4	m	12	2,8	2,3	14,6	11,7	gesund
5		12	4,6	4,6	16,6	16,6	Lipocalcinogranulomatose
				3,0		16,0	Jahresmittelwert
1	w	13	2,7	2,8	12,2	16,6	multiple Sklerose
2	m	13	6,1	6,1	13,1	13,1	unbekannt
3	w	13	-	-	10,5	16,0	Neurofibromatose
4	m	13	-	-	19,0	13,3	Rheumatismus
				4,5		14,7	Jahresmittelwert
1	m	14	2,6	3,8	14,4	21,6	Z.n.Hepatitis epid.
2	m	14	4,6	2,3	16,8	13,0	Kopfschmerzen
3	w	14	3,6	1,4	33,6	13,4	Verletzung am Fuß
4	m	14	1,3	1,3	13,6	13,6	Z.n.rudim. Dysostosis enchondralis
				2,3		15,4	Jahresmittelwert

Tabelle 3:

Statistische Auswertung der Meßergebnisse

Monate	Alter	Anzahl der Fälle, n	Gruppenmittelwert mit Vertrauensbereich (S=95%) $\bar{x} \pm t \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}$	mittlere quadr. Abweichung $s = \pm \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$	Variationskoeffizient $V = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\%$
1	2	3	4	5	6
17 - KS mg/l					
1-3		16	1,1 ± 0,4	± 0,7	63,5 %
4-11		9	0,7 ± 0,3	± 0,5	71,4 %
1-3		8	1,3 ± 1,3	± 1,5	115,0 %
4-6		19	1,7 ± 0,7	± 1,4	82,4 %
7-9		16	1,9 ± 0,7	± 1,3	68,4 %
10-14		19	3,0 ± 0,6	± 1,2	40,0 %
17 - KS mg/die					
1-3		16	0,3 ± 0,2	± 0,3	100,0 %
4-11		9	0,2 ± 0,2	± 0,2	100,0 %
1-3		8	0,5 ± 0,4	± 0,5	100,0 %
4-6		19	0,9 ± 0,3	± 0,6	66,6 %
7-9		16	1,4 ± 0,4	± 0,8	57,1 %
10-14		19	2,7 ± 0,6	± 1,3	48,2 %
Gesamt - 17 KGS mg/l					
1-3		17	9,2 ± 2,1	± 4,0	43,5 %
4-11		9	5,4 ± 2,2	± 2,6	48,1 %
1-3		8	12,4 ± 4,2	± 5,0	40,3 %
4-6		20	12,9 ± 2,8	± 6,0	47,2 %
7-9		20	13,8 ± 3,2	± 7,0	44,9 %
10-14		22	16,0 ± 2,6	± 5,8	30,5 %
Gesamt - 17 KGS mg/die					
1-3		17	2,3 ± 0,4	± 0,7	30,4 %
4-11		9	1,4 ± 0,5	± 0,6	45,5 %
1-3		8	4,5 ± 1,7	± 2,0	44,6 %
4-6		20	6,5 ± 1,2	± 2,5	38,8 %
7-9		20	9,9 ± 1,5	± 3,3	33,3 %
10-14		22	14,5 ± 1,4	± 3,2	22,1 %

Tabelle 3: Statistische Auswertung der Meßergebnisse

Abb. 1a

17-KS mg/Liter = Säuglinge =

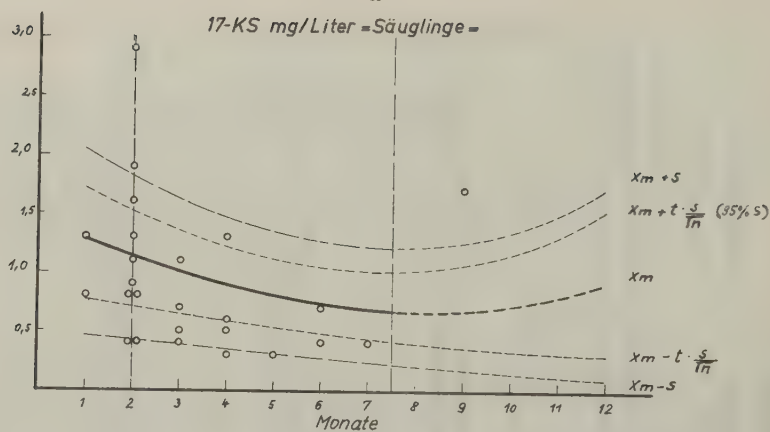
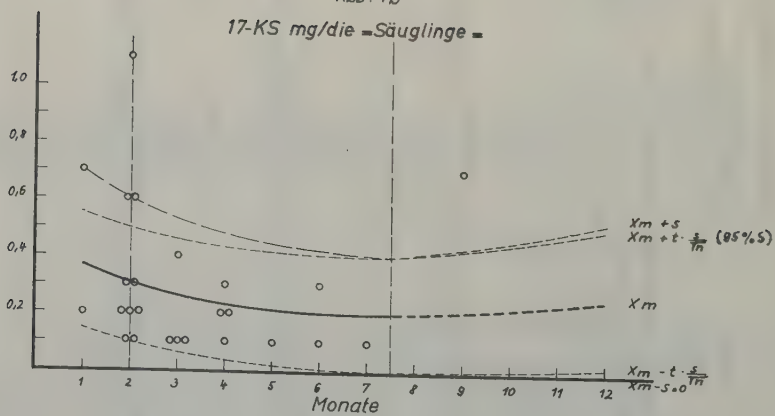


Abb. 1b

17-KS mg/die = Säuglinge =



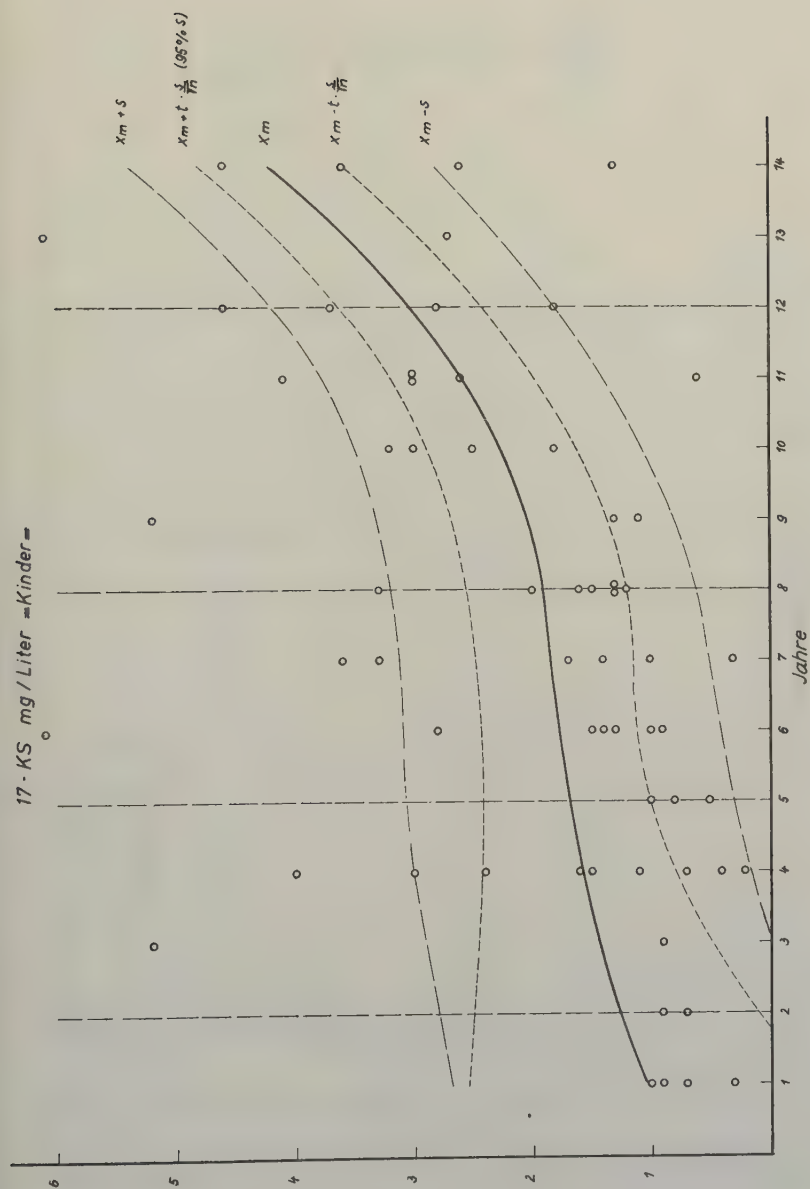


Abb. 3
17-KS mg/die = Kinder =

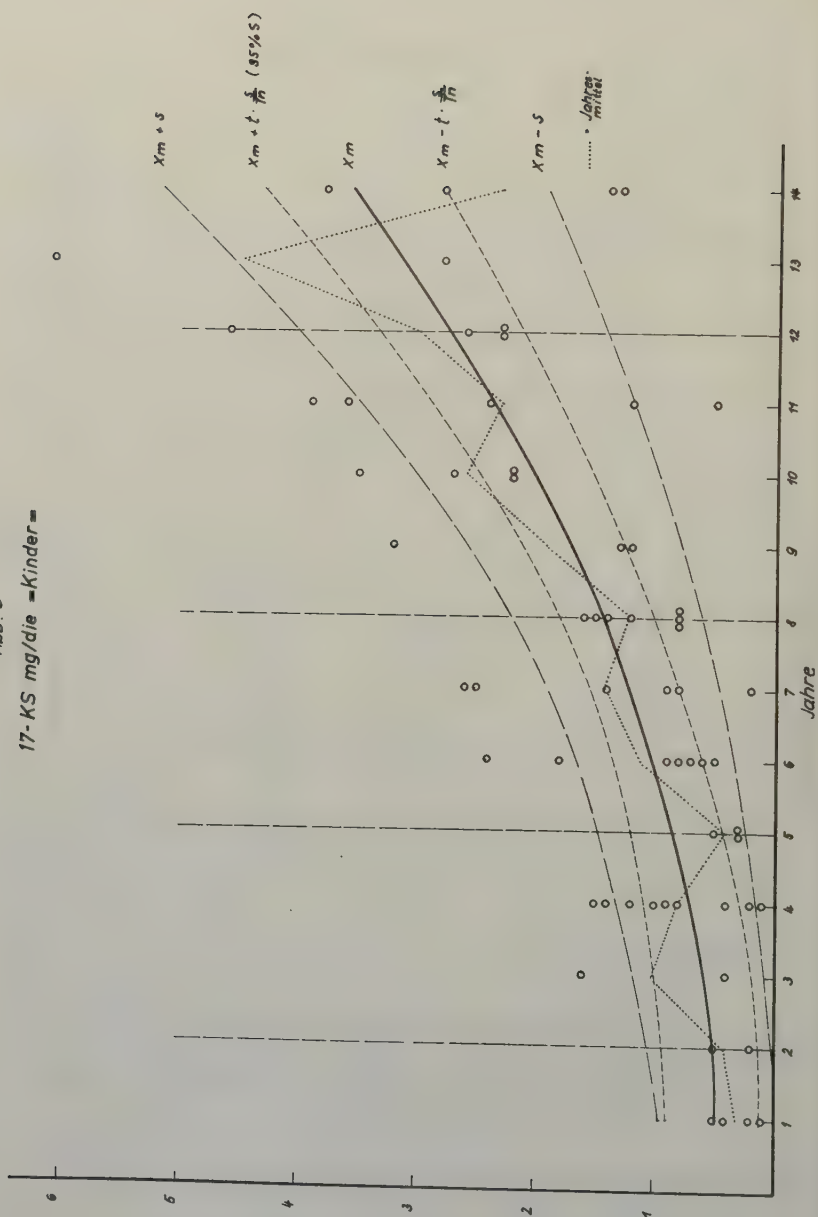


Abb. 4a

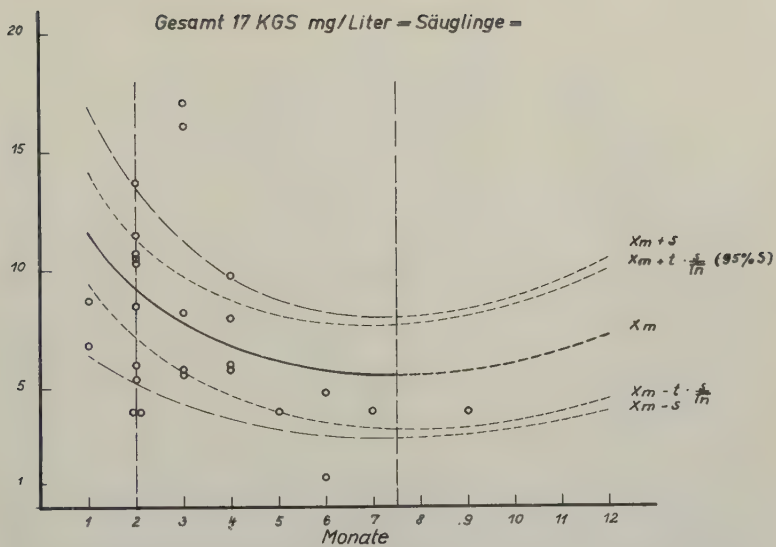


Abb. 4b

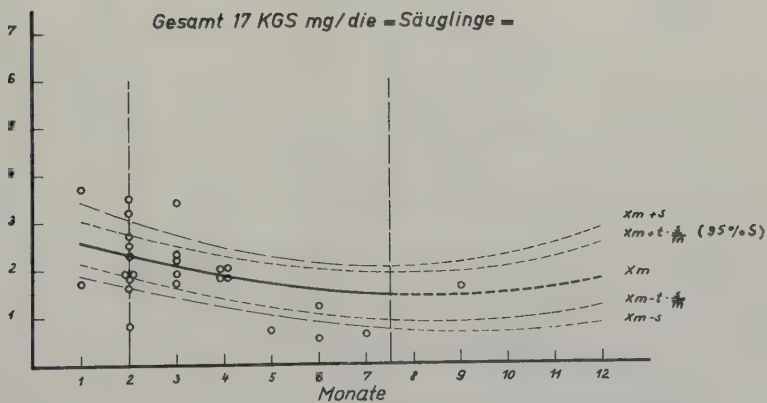


Abb. 5

17-KGS mg/Liter = Kinder =

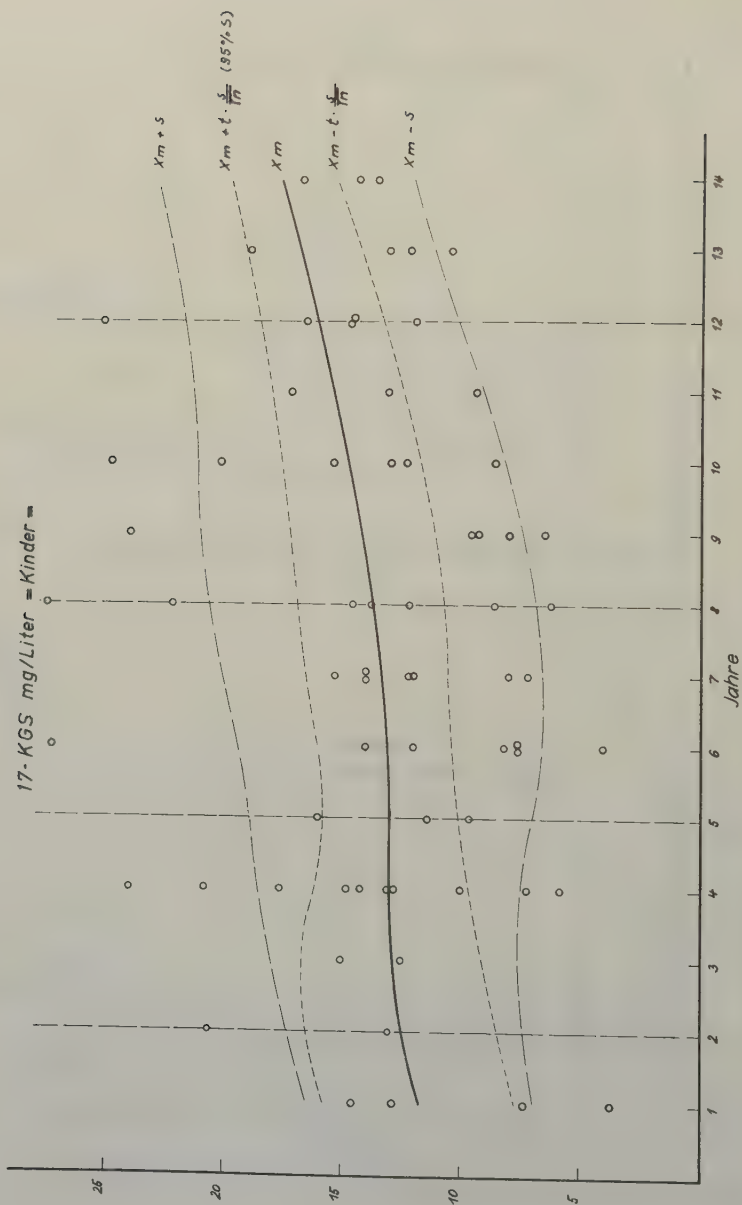
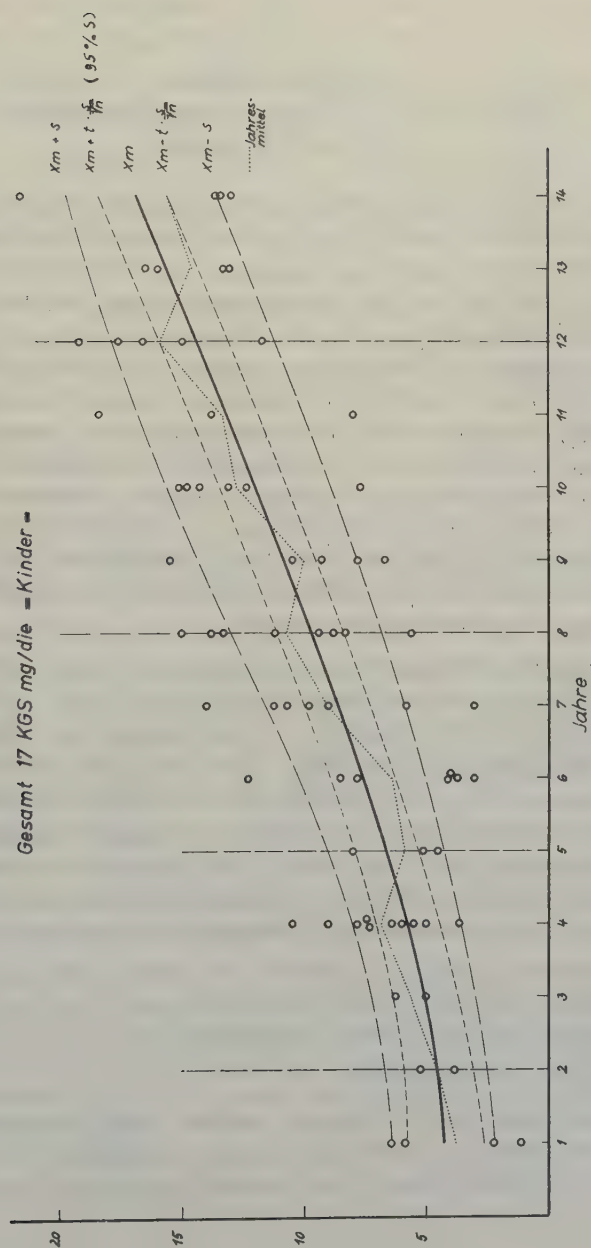


Abb. 6
Gesamt 17 KGS mg/die - Kinder -



UNTERSUCHUNG DER 17 KS UND 17 KGS-AUSSCHIEDUNG IM URIN NACH ACTH-ZUFUHR

Die NN besitzt eine gewisse eigene Grundsekretion, die unter dem Einfluß des adrenocorticotropen (ACTH) Hormones der Hypophyse steht. Bei Belastung oder Stressituationen wird durch vermehrte Sekretion von ACTH die Steroidausscheidung erhöht. Die Bildung von ACTH erfolgt wahrscheinlich in den basophilen Zellen des Hypophysenvorderlappens und wird von den im Blute befindlichen Gluco-Cst beeinflusst. Hohe zirkulierende Cst-Mengen bewirken eine Hemmung der ACTH-Produktion, niedrige Werte regen sie an. Durch diesen Rückkoppelungsmechanismus wird die Steroid-Ausscheidung den jeweiligen Erfordernissen des Organismus angepaßt. Während beim gesunden Menschen also eine Homöostase, ein endokrines Gleichgewicht, aufrechterhalten wird, das durch Hormonzufuhr nur gestört würde, kann der Arzt bei patholog. Zuständen durch exogene Hormongaben in die Steuerung eingreifen.

Wenn aus therap. Gründen eine längerdauernde Zufuhr von Cst. nötig ist, ohne daß eine NNR-Insuffizienz besteht, kann es, durch die Bremsung der ACTH-Produktion, zu einer Atrophie der NNR kommen. Beim Absetzen der Rindenhormone muß dann durch ACTH-Gaben die Tätigkeit der NNR wieder angeregt werden. Die Stimulierung mit exogen zugeführtem ACTH wird auch zur Diagnostik der Rindenfunktion verwendet. Dabei werden dann die typischen Stoffwechselwirkungen geprüft, z.B. die Wasser- oder Na-Ausscheidung, oder man beobachtet den Abfall der eosinophilen Zellen im peripheren Blut (Thorn-Test).

Genauer ist es natürlich, nach der ACTH-Zufuhr die Ausscheidung der Cst oder ihrer Metaboliten direkt zu messen. Geeignete Nachweismethoden der Cst im Blut und Harn lassen dann am besten die Tätigkeit der NNR erkennen.

Es wurden daher auch mit unserer Methode einige Urinproben vor und nach Zufuhr von ACTH (25 E, i.m.) untersucht (s. Abb. 7 - 9, Tab. 4, 5). Dabei konnte, wie erwartet, regelmäßig ein Anstieg der

Gesamt- 17 KGS beobachtet werden, während die 17 KS-Ausscheidung sich sehr unregelmäßig verhielt.

Dasselbe Verhalten der beiden Gruppen wurde auch schon bei ACTH-Ausschüttung infolge stress beschrieben.

Die höheren Ergebnisse der 17 KGS nach ACTH beweisen auch, daß die bestimmten Substanzen, im Gegensatz zu den 17 KS, hauptsächlich von der NNR stammen und die Methode zur Prüfung der Rindenfunktion geeignet ist.

Die Höhe des Anstiegs ist sehr verschieden. Bei den 17 KS betrug der prozentuale Anstieg, bzw. Abfall (bezogen auf den Ausgangswert = 100%) bei den Säuglingen -20 bis 400%, bei Kindern -30 bis 226%;

die Erhöhung der 17 KGS schwankt bei den Säuglingen von 40 - 600%, bei den Kindern von 10 - 600%.

Das Ansprechen auf ACTH ist individuell sehr verschieden. Man erklärt es damit, daß jedes Individuum gewissermaßen ein eigenes "steroidpattern" besitzt (ROSENKILDE und SCHROEDER, 1957).

Dazu kommen bei den Kindern noch die altersmäßig bedingten Schwankungen und in unserem Fall die Krankenhausituation. Nach der Theorie von Selye reagiert ein kranker Organismus anders auf einen stress als ein gesunder; z.B. sollen längere Zeit kranke oder unterernährte Personen nur noch schwach oder gar nicht mehr auf ACTH reagieren (PINCUS, 1948; ROMANOFF, 1949).

Der gefundene Anstieg der Gesamt 17 KGS erweckt allerdings den Anschein, als ob eine gewisse Abhängigkeit vom Ausgangswert vorhanden wäre. Aus dem Säulendiagramm (Abb. 9) läßt sich erkennen, daß die Stimulierung durch ACTH umso wirksamer war, je kleiner der Ausgangswert ist. Umgekehrt bei hohen Ausgangswerten nur noch eine geringe Steigerung erzielt würde. Auf Abb. 10 - 13 wurde daher der prozentuale Anstieg in Abhängigkeit von der Höhe des Ausgangswertes dargestellt. Dabei läßt sich klar ein Nachlassen des Anstieges der 17 KGS mg/die mit zunehmendem Ausgangswert erkennen (Abb. 13).

Dies spricht dafür, daß eine gewisse optimale Leistungsgrenze besteht, bis zu welcher unter normalen Umständen eine Steigerung der Produktion möglich ist.

Die geringe Anzahl der Untersuchungen gestattet aber keine Sicherung dieser Behauptung. Ebenso läßt sich daher nichts über die Altersabhängigkeit aussagen.

Tabelle: 5

- Kinder -

No.	Alter Jahre	17 - KS				Gesamt 17 - KGS								Diagnose	Alter Nr.				Bemerkungen
		vor ACTH		nach ACTH		vor ACTH		nach ACTH		Anstieg		Anstieg			Jahre	14	15	16	
		mg/Liter		mg/Liter		mg/Liter		mg/Liter		± %		± %							
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12								
1	2	-	-	-	0,2	-	0,6	+ 200	-	1,1	-	7,7	+ 600	-	-	-	-		
1	1	-	0,2	-	0,6	-	0,6	+ 200	-	1,1	-	7,7	+ 600	-	-	1	1		
2a	4	4,0	1,4	4,2	1,0	-	28,5	20,8	7,3	43,2	10,8	+ 50	chron. Encephalitis	4	2a				
2b	4	-	1,5	-	1,8	+ 20	-	5,0	-	18,4	+ 268	exog. Fettsucht	4	2b					
3a	7	-	2,5	-	2,1	- 16	-	10,7	-	13,2	+ 23	Pseudohermaphrod.	7	3a					
												inasc.							
3b	7	-	0,2	-	0,4	+ 100	-	9,8	-	12,8	+ 31	Neuropathie	7	3b					
4a	8	1,3	1,5	3,7	4,9	+ 226	8,6	9,4	20,0	25,6	+ 127	Z.n. Hepatitis	8	4a					
4b	8	1,0	0,9	1,1	0,7	- 22,2	12,2	11,2	25,8	16,8	+ 50	Obstipation	8	4b					
5a	10	-	-	-	-	-	-	7,7	-	15,6	+ 103	Z.n. Nephritis	10	5a					
5b	10	0,6	0,5	0,9	1,00	+ 100	9,4	8,0	17,6	19,4	+ 143	psychog. Anfälle	10	5b					
6	11	3,0	1,3	3,2	2,7	+ 108	9,8	4,1	20,0	17,0	+ 315	Z.n. Herzoperat.	11	6					
7	12	1,8	2,25	3,5	3,9	+ 73	12,0	15,0	15,0	16,7	+ 11	Z.n. Hepatit. epid.	12	7					
8a	13	1,1	1,7	1,4	1,2	- 29,3	10,5	16,0	19,7	17,7	+ 10	Neurofibromatose	13	8a					
8b	13	1,1	0,8	0,9	0,7	- 12,5	15,3	10,0	19,0	13,3	+ 33	Rheumatismus	13	8b					
9	14	-	2,0	-	4,7	+ 135	-	7,4	-	25,5	+ 245	Mongolismus	14	9					
												Hypoph. Kleinwuchs							
				Mittel		+ 65				Mittel	+ 143,5								
				Schwankung		+ 226	./.	- 29,3		Schwankung	+ 600	./.	+ 10						

Abb. 7a

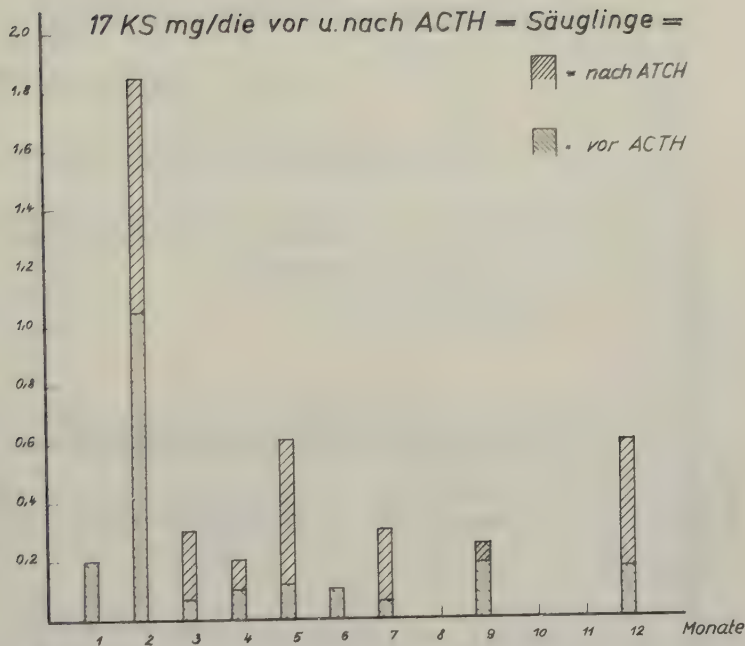


Abb. 7b

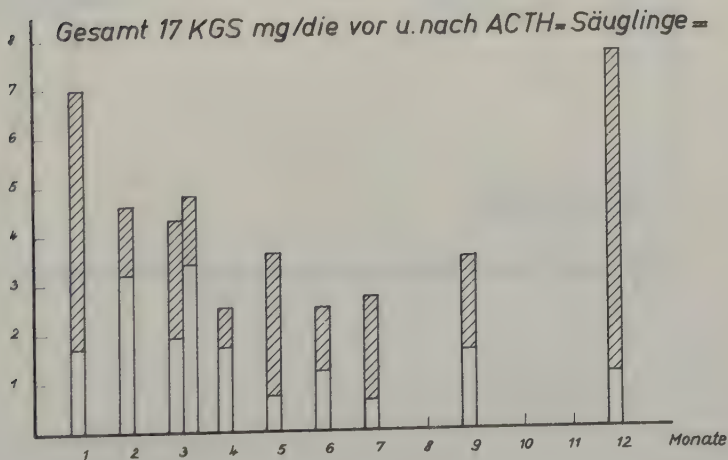


Abb. 8
17 KS mg/die vor u. nach ACTH — Kinder —

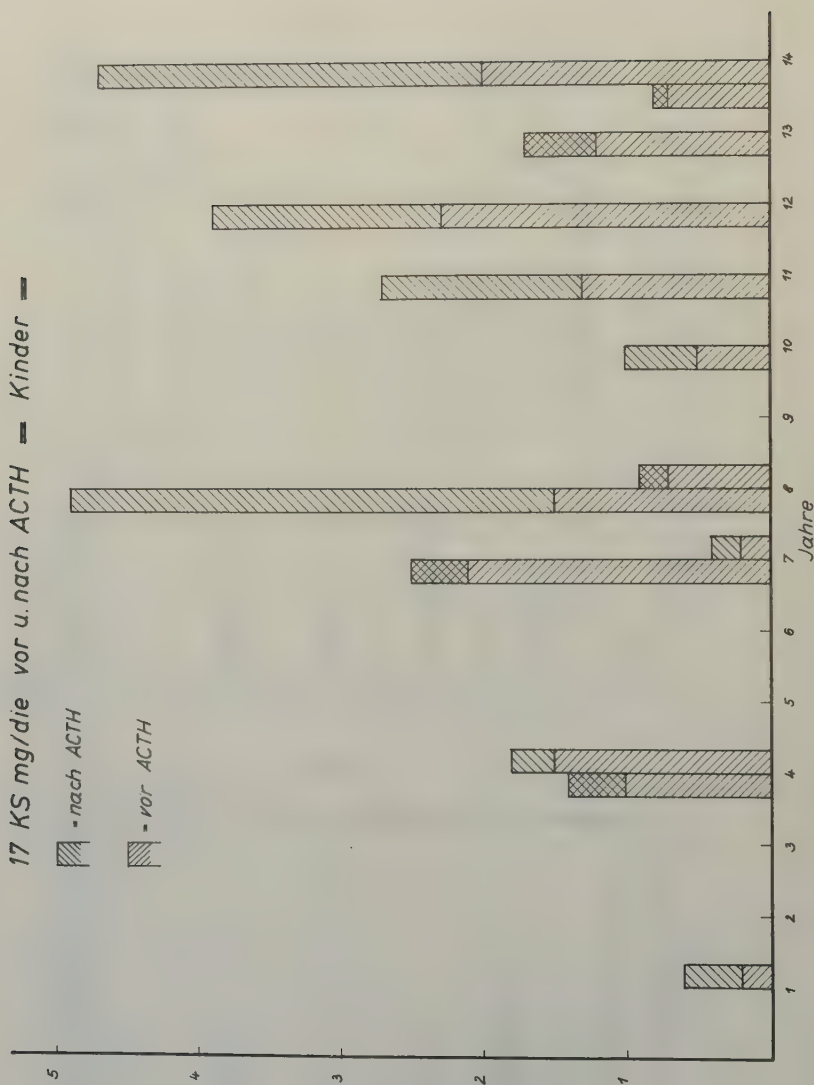


Abb. 9

Gesamt 17 KGS mg/die vor u. nach ACTH = Kinder ==

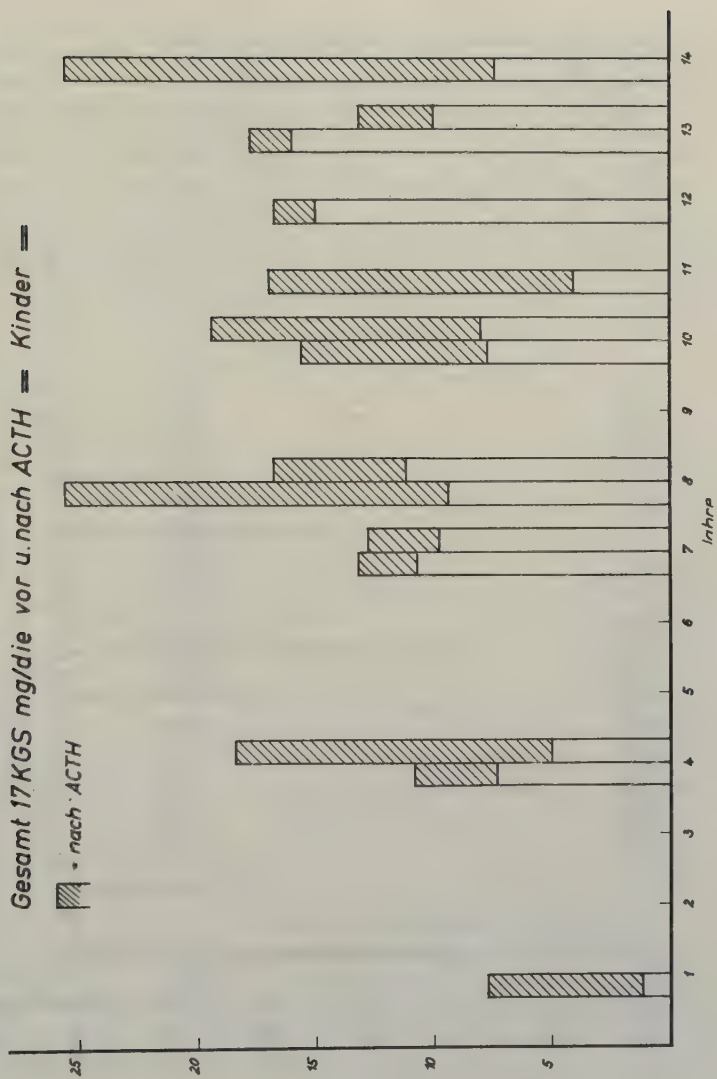
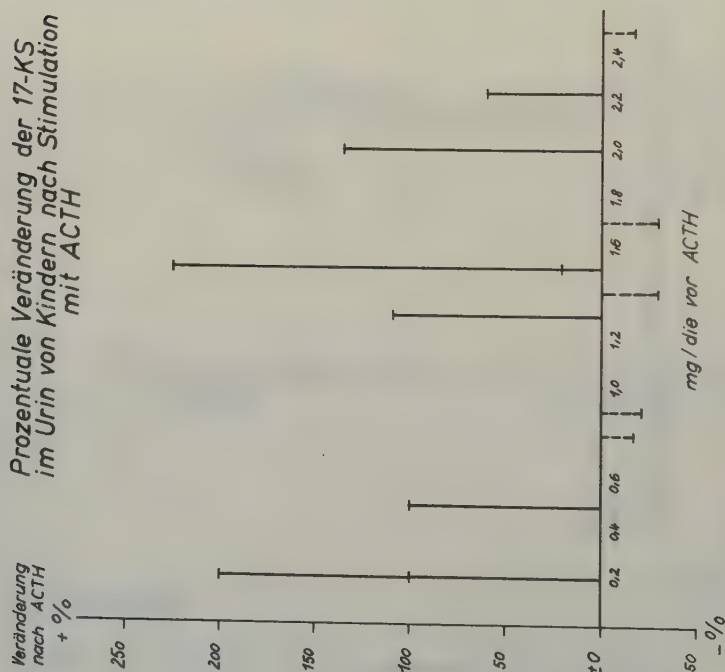


Abb. 11

Prozentuale Veränderung der 17-KS im Urin von Kindern nach Stimulation mit ACTH



17 - KS		Veränderung + %	Alter jahre
vor	nach ACTH mg/die		
0,2	0,6	+200	1
0,2	0,4	+100	7
0,5	1,0	+100	10
0,8	0,7	-125	13
0,9	0,7	-222	8
1,3	2,7	+108	11
1,4	1,0	-285	4
1,5	1,8	+20	4
1,5	4,9	+226	8
1,7	1,2	-293	13
2,0	4,7	+135	14
2,25	3,9	+73	12
2,5	2,1	-16	7

Abb. 10

Prozentuale Veränderung der 17-KS
im Urin von Säuglingen nach Stimulation
mit ACTH

17 KS		Verän- derung ± %	Alter Monate
vor	1 nach ACTH		
mg/die	mg/die		
1	2		
0,06	0,3	+ 400	7
0,07	0,3	+ 330	3
0,1	0,2	+ 100	4
0,1	0,1	± 0	8
0,12	0,6	+ 400	5
0,2	0,2	± 0	1
0,2	0,6	+ 200	12
0,25	0,2	- 20	9
1,06	1,85	+ 75	2

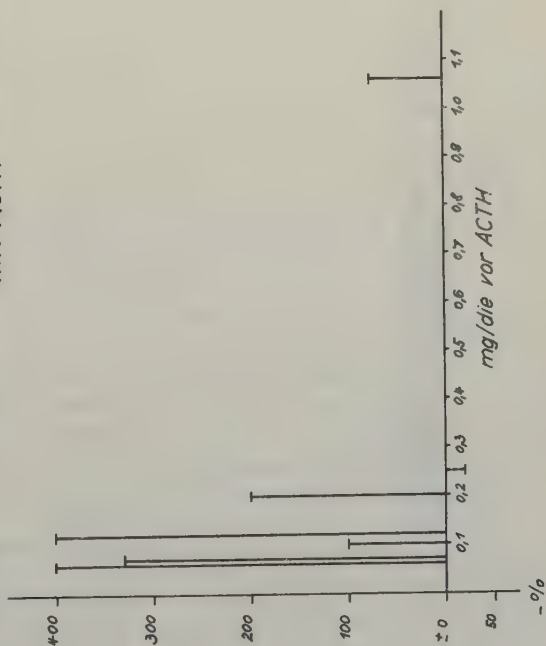
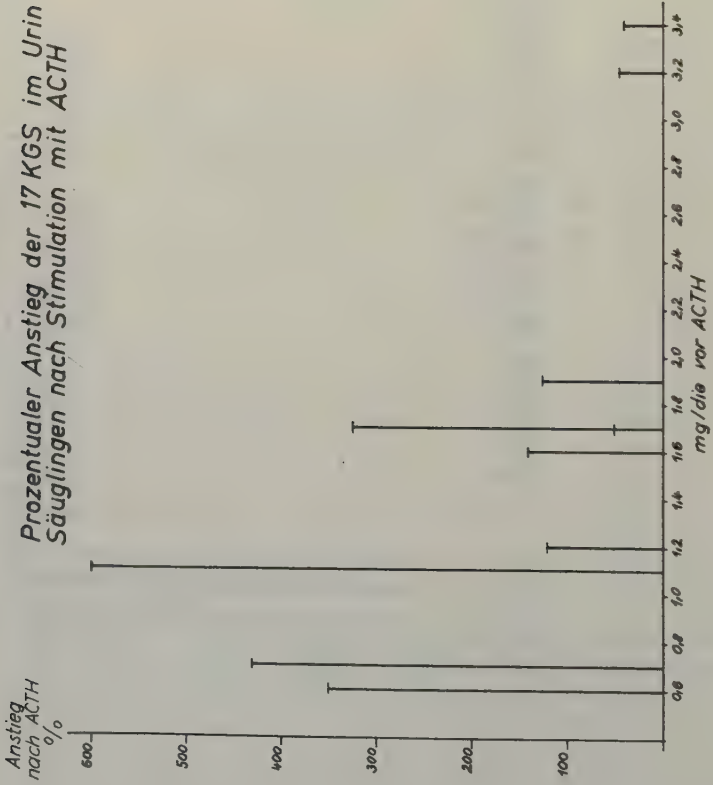


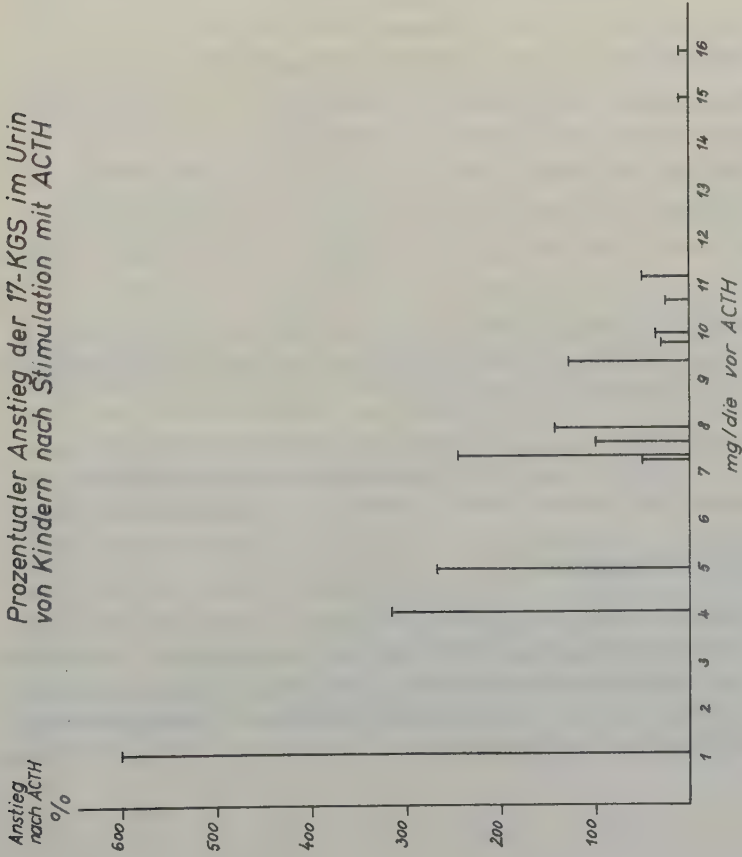
Abb. 12
Prozentualer Anstieg der 17 KGS im Urin von
Säuglingen nach Stimulation mit ACTH



17 KGS		Anstieg %	Alter Monate
vor ACTH	nach ACTH		
mg/die	mg/die		
1	2	3	4
0,6	2,7	350	7
0,7	3,6	414	5
1,1	7,7	600	12
1,2	2,5	108	6
1,6	3,5	118	9
1,7	7,0	312	1
1,7	2,5	47	4
1,9	4,3	126	3
3,2	4,6	44	2
3,4	4,8	41	3

Abb. 13

Prozentualer Anstieg der 17-KGS im Urin
von Kindern nach Stimulation mit ACTH



17 KGS		Anstieg	Alter
vor	nach		
ACTH			
mg/die		%	Jahre
1	2	3	4
1,1	7,7	600	1
4,1	17,0	315	11
5,0	18,4	268	4
7,3	10,8	50	4
7,4	25,5	245	14
7,7	15,6	103	10
8,0	19,4	143	10
9,4	25,6	127	8
9,8	12,8	31	7
10,0	13,3	33	13
10,7	13,2	23	7
11,2	16,8	50	8
15,0	16,7	11	12
16,0	17,7	10	13

V. ERGEBNISSE BISHER DURCHGEFÜHRTER 17 KGS - BESTIMMUNGEN

In neuerer Zeit wurden eine Reihe von Untersuchungen der Cst. und 17 KS mit der Methode von NORYMBERSKI veröffentlicht. Dabei gefundene Normalwerte stimmen in Größe und Schwankungsbreite zum Teil gut mit den von NORYMBERSKI 1953 angegebenen Werten überein. Er fand bei gesunden Männern eine Cst.-Ausscheidung von 3,6 - 19,2 mg pro Tag; bei Frauen 4,6 - 13,4 mg. Bei Kindern von 6-11 Jahren erhielt er Werte von 2,3 - 3,8 mg/die.

DICZFALUSY (1955) stellte Normalwerte von 11,1 - 22,1 mg/die bei Männern und 6,9 - 17,9 mg/die bei Frauen fest.

Auf breiter Basis durchgeführte Untersuchungen von SCHÜLLER (1956) ergaben obere und untere Streuwerte (bei 95% Genauigkeit von 7,5 - 36,0 mg/die bei Männern und 4,0 - 28,3 mg/die bei Frauen.

Von BREUER und NOCKE (1957) gefundene Werte betrugen bei gesunden männl. Personen 9,4 - 18,8 mg/die; bei weibl. 5,0 - 16,4 mg/die.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der einzelnen Autoren können dabei auch durch Änderungen in der experimentellen Ausführung bedingt sein (s. Colorimetrie S. 42).

Mit der Modifikation von APPLEBY (1954) bestimmte BORTH u.a. (1957) die 17-OH-Cst. Bei Kindern fanden sie folgende Werte: für Knaben und Mädchen von 0 - 10 Jhr.: 1 - 4 mg/die; von 10 - 20 Jahren 4 - 10 mg/die bei männlichen, und 4 - 8 mg/die bei weiblichen Probanden.

Im Vergleich damit sind die in dieser Arbeit berichteten Werte der 17 KGS-Ausscheidung bei Kindern höher. Die Mittelwerte bei Kindern von 1 - 14 Jahren reichen von 4,5 - 14,5 mg/die und kommen somit ungefähr den von NORYMBERSKI und anderen Autoren berichteten Normalwerten bei Erwachsenen gleich. Dies beweist erneut die bereits

erwähnte Tatsache, daß die colorimetrische Bestimmung der 17 KGS mit der von uns angewandten "2-Filtermethode" höhere Werte ergibt.

PHYSIOLOG. UND PATHOLOG. BEEINFLUSSUNG DER 17 KGS- UND 17 KS-AUSSCHIEDUNG

Da die Bestimmung der 17 KGS eine sehr empfindliche Methode darstellt, wurde übereinstimmend eine große methodische Streubreite festgestellt. SCHÜLLER (1956) errechnete ähnlich wie DICZFALUSY (1955) eine Streuung der Methode (bei 99% Sicherheit) von 2,3 mg/die. Dazu kommen beträchtliche Tagesschwankungen.

Das Maximum der tägl. Ausscheidung fällt auf den Morgen, nach dem Arbeitsbeginn. Die Ausscheidung in der Nacht ist verhältnismäßig niedrig. Außerdem müssen die großen individuellen Differenzen berücksichtigt werden.

Stress-Faktoren, wie körperliche und geistige Anstrengung, Aufregung und Witterungseinflüsse (LAROS, 1956) wirken sich auf die Sekretion der 17 KGS viel deutlicher aus, als bei den 17 KS.

Untersuchungen der 17-KGS- und 17-KS-Ausscheidung von CONNEL u.a. 1958 haben ergeben, daß vor allem emotionelle Spannungen, wie z.B. Examen, zu einem bedeutenden Anstieg der 17 KGS im Urin führen. Die 17 KS sind dabei nur leicht erhöht. Man erklärt es damit, daß der Körper gewissermaßen eine Alarmreaktion mit einer Mehrsekretion von NNR-Hormonen auslöst, der aber dann kein körperlicher Verbrauch folgt. Man spricht daher von einer biologischen Verschwendung.

Dagegen verursachen rein körperliche Anstrengungen, ohne gefühlsmäßige Erregung, keine Erhöhung der 17 KGS-Ausscheidung im Urin. Das könnte bedeuten, daß die NNR überhaupt nicht auf körperliche Aktivität antwortet oder aber daß eine Mehrsekretion durch den erhöhten peripheren Verbrauch der NNR-Hormone bei körperlicher Arbeit ausgeglichen wird (HILL u.a. 1956).

Bei den 17 KS kommt es unter den gleichen Umständen sogar zu einem Absinken der Ausscheidung, da nach einem "stress" eine Androgen-Schuld der Gewebe entstehen soll.

VESTERGAARD und LEVERET (1957) haben beobachtet, daß manche Patienten verhältnismäßig stabile Ausscheidungswerte der 17 KS aufweisen, welche auch durch Faktoren wie Ernährung, Erregung, Klima usw. nicht beeinflußt werden können. Während bei Personen mit labilen Werten vor allem emotionelle Gründe eine Erhöhung der Cst. veranlassen.

BORTH (1957) untersuchte in seiner Arbeit, welchen Einfluß Geschlecht, Alter, Gewicht und Größe auf die Ausscheidung der 17-OH-Cst. und 17-KS ausüben.

Dabei fand er, daß sowohl bei Männern wie bei Frauen die Ausscheidung der 17-KS viel mehr altersabhängig ist, als die der 17-OH-Cst. Diese nehmen jedoch auch mit steigendem Alter zu, erreichen Spitzenwerte von 16,4 mg/die bei Männern mit 40 und 10,6 mg/die bei Frauen mit 30 Jahren. Dann fällt die Kurve wieder langsam ab (SCHÜLLER, 1956).

Ebenfalls läßt sich eine Geschlechtsverschiedenheit erkennen. Die Ausscheidungs menge der 17 KGS, bzw. 17-OH-Cst. ist beim Manne wesentlich höher als bei der Frau. NORYMBERSKI fand schon eine Erhöhung des 17 KGS-Spiegels beim Mann gegenüber der Frau um 40%.

Da aber Höhe und Gewicht ebenfalls in linearer Beziehung zur Cst-Sekretion stehen, kann der Unterschied auch in der durchschnittlich größeren Höhe und Gewicht der Männer liegen (BORTH, 1957). Dies erklärt auch, daß bei den Kindern eine viel deutlichere Zunahme der Ausscheidung zu erkennen ist. In dieser Beziehung zeigen die 17-KS ein ganz anderes Verhalten. Extremgroße, leptosome Typen neigen zu einer viel geringeren Ausscheidung, als kleine vom selben Alter, Gewicht und Geschlecht. Aber auch, wenn man diese Faktoren außer Acht läßt, bleibt noch eine männl. Mehrausscheidung der 17 KS um 30%. Dies läßt sich aber ohne weiteres durch den Einfluß von Testikular-Hormonen auf die 17-KS-Fraktion erklären. Bei Kindern dürfte diese Komponente noch nicht ausschlaggebend sein.

Es konnte daher auch in den vorliegenden Untersuchungen kein signifikanter Unterschied zwischen Knaben und Mädchen, sowohl in der Ausscheidung der 17 KS, wie auch der 17-KGS festgestellt werden.

Welche diagnostische Bedeutung kommt nun der Bestimmung der 17-KGS im Urin zu ?

Während die tägliche Ausscheidung bei gesunden Personen doch innerhalb gewisser Grenzen bleibt, findet man bei Dysfunktionen der NNR ganz erhebliche Tagesschwankungen.

Besonders hohe Tagesschwankungen kommen beim Cushing-Syndrom vor. In allen Fällen wurde dabei eine Erhöhung der 17-KGS festgestellt. (NORYMBERSKI, 1953; DICZFALUSY, 1956; HUSSLEIN und SCHÜLLER, 1956).

Wie BREUER und NOCKE (1957) berichten, werden dabei vor allem Compound F-wirksame Cst. und Metaboliten gebildet.

Auch bei Hypophysen-Affektionen mit sekundärer NN-Hyperplasie kann die Cst. Ausscheidung gesteigert sein. Ebenso nehmen sie bei benignen NN-Tumoren deutlich zu, im Gegensatz zu den 17 KS. Dies ist für die Differenzialdiagnose von großer Wichtigkeit, da sonst auch die 17-KS stark erhöht sind (DICZFALUSY, 1956).

Bei vermehrter Androgenproduktion deutet eine erhöhte Cst.-Ausscheidung darauf hin, daß eine Krankheit der NN und nicht aber von Hoden oder Ovar vorliegt. Die 17-KS würden dann in beiden Fällen gesteigert sein. Andererseits fand man auch bei manchen ovariellen Dys- oder Hypofunktionen eine vermehrte Cst.-Ausscheidung (17 KGS). In diesen Fällen, welche auf Oestrogengaben nicht ansprachen, konnte durch Cortison eine Besserung erzielt werden (HUSSLEIN und SCHÜLLER, 1956).

Als Ursache nimmt man an, daß ein ACTH-Überschuß eine mangelnde Gonatropinausschüttung der Hypophyse zur Folge hat. Somit ist die Bestimmung der Cst. auch in der Gynäkologie von Bedeutung. Die höchsten Werte für 17-KS und 17 KGS fand man bei adrenogenitalem Syndrom. Es scheint, daß dabei die Biosynthese von Compound F aus Cholesterin auf der Stufe von 17-Oxyprogesteron gehemmt wird.

Dadurch fällt die regulierende Wirkung von Hydrocortison auf die Sekretion der Adenohypophyse fort und es kommt zu einer unehemmtten Produktion von ACTH. Dies erzeugt eine Hyperplasie der NNR und somit eine weitere Steigerung von 17-Oxyprogesteron und Androgenen.

Es wurde festgestellt, daß auch das 17-Oxy-progesteron eine stark virilisierende Wirkung besitzt. 17-Oxyprogesteron ist keine ketogene Substanz, aber sein Metabolit, Pregnan -3 α , 17 α , 20 α -triol konnte bei AGS in großer Menge im Harn nachgewiesen werden (BONGIOVANNI u.a., 1955).

Ob die Vermehrung der Cst.-Produktion auf einen Tumor oder nur auf eine Hyperplasie der NNR zurückgeht, läßt sich durch die Cortisonprobe nach WILKINS entscheiden. Durch die Zufuhr von Cortison (tgl. 50 mg) kommt es, über die Bremsung der ACTH-Produktion zu einem Rückgang der Cst-Ausscheidung der hyperplastischen NNR.

Bei einem Tumor dagegen fällt diese Probe negativ aus.

Eine verminderte Cst.-Ausscheidung, bis zu 0 mg, erhielt man beim m. Addison.

Sie kann aber auch durch eine hypophysäre Insuffizienz (Simmonds'sche-Krankheit) bedingt sein. Als Differenzialdiagnose dient die Stimulierung mit Corticotropin. Sie spricht im Falle der Simmonds'schen Kachexie an, während sie bei m. Addison negativ ausfällt.

Eine Substitutionstherapie mit Cortison und Hydrocortison kann durch die Bestimmung der 17 KGS dauernd überwacht werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Nach einem Überblick über Wesen und Funktion der NNR-Hormone wurden ihre bisher üblichen Bestimmungsmethoden in Harn aufgezählt und auf die Schwierigkeiten, besonders der Hydrolyse, Fraktionierung und der colorimetr. Messung hingewiesen. Diese Hindernisse werden durch die Bestimmung der 17 KGS nach NORYMBERSKI teilweise umgangen.

Die Spezifität und die experimentellen Voraussetzungen dieser Methode wurden nach Literaturhinweisen beschrieben. Verschiedene Möglichkeiten der Colorimetrie (ZIMMERMANN und CALLOW) wurden erwähnt und ihre Auswirkung auf die Ergebnisse diskutiert.

Die angewandte Methode zur Bestimmung der 17 KGS wurde eingehend geschildert und die, bei den Kindern erhaltenen Werte der 17 KS und 17 KGS-Ausscheidung in Tabellen und Kurven wiedergegeben.

Bei den Säuglingen ließ sich, außer einem leichten Abfall der Hormonausscheidung beider Gruppen innerhalb des ersten Trimenon, mit einem Mittelwert der 17 KGS von $2,3 \pm 0,4$ mg/die (95% Sicherheit), keine Aussage machen, da das Material zu gering war.

Bei den Kindern fand sich ein eindeutiger Anstieg der Tagesausscheidung der 17 KGS mit dem Alter, während sich keine Abhängigkeit von der Urinmenge ergab.

Die gefundenen Werte schwanken zwischen

$1,1 - 21,6$ mg/die (1 - 14 Jahre).

Die Mittelwerte der einzelnen Altersgruppen betragen:

1 - 3 Jhr.:	$4,5 \pm 1,7$ mg/die (95% Sicherheit)
4 - 6 Jhr.:	$6,5 \pm 1,2$ mg/die
7 - 9 Jhr.:	$9,9 \pm 1,5$ mg/die
10 - 14 Jhr.:	$14,5 \pm 1,4$ mg/die.

Die Ergebnisse von Urinuntersuchungen vor und nach ACTH-Gaben wurden durch Diagramme dargestellt. Dabei zeigte sich eine mögliche Abhängigkeit des Anstiegs der 17 KGS/die von der jeweiligen Grundsekretion.

Zum Schluß wurden die Ergebnisse neuerer Arbeiten über die 17 KGS-Bestimmung berichtet und auf die diagnostische Verwertbarkeit der Cst-Bestimmung hingewiesen.

Für die Erlaubnis, meine experimentellen Arbeiten im Labor des Dr. von Hauner'schen Kinderspitals ausführen zu dürfen, bin ich dem Professor für Kinderheilkunde und Direktor der Universitätskinderklinik Herrn Dr. med. Alfred WISKOTT zu besonderem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. med. Walter FREISLEDERER, der mir im Rahmen seiner wissenschaftlichen und praktischen Untersuchungen das Thema zur Behandlung freundlichst überlassen hat, möchte ich an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank aussprechen, für seine wertvollen Ratschläge sowie seine Geduld und Mühe bei der Leitung der Arbeit.

LITERATURVERZEICHNIS

- Allen, W.M.: J.Clin.Endocrin. 10, 54/71, 1950
- Appleby, J.I., G.Gibson, J.K.Norymberski, R.D.Stubbs:
Biochem.J. 60, 453, 1955
- Appleby, J.I., J.K.Norymberski:
Biochem. J. 60, 460, 1955
- Appleby, J.I., G.Gibson, J.K.Norymberski, R.D.Stubbs:
Biochem. J. 57, xiv, 1954
- Bagget, B., J.H.Glick, jr., R.A.Kinsella, jr.:
J.Clin.Invest. 31, 615, 1952
- Bassil, G.T., A.M.Hain:
Nature 165, 525, 1950
- Beck, J.C., J.Dyrenfurth, C.Giroud, E.H.Venning:
Arch.Int.Med. 96, 463, 1955
- Bierich, J.R., E.Bohe, B.Zimmermann:
Klin.Wschr., 469, 1956
- Bitman, J., S.L.Cohen: J.Biol. Chem. 191, 351, 1951
- Bliss, E.L., A.A.Sandberg, D.H.Nelson, K.Eik-Nes:
J.Clin.Invest. 32, 818, 1953
- Bondy, P.K., J.R.Altrock:
J.Clin.Invest. 32, 703, 1953
- Bongiovanni, A.M., W.R.Eberlein:
Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 89, 281, 1955
- Bongiovanni, A.M., W.R.Eberlein:
J.Clin.Invest. 34, 1337, 1955
- Borth, R., A.Linder, H.Riondel:
Acta Endocrinol.(Kopenh.) 25, 33, 1957

- Borth, R.: Acta Endocrinol.(Kopenh.) 22, 125, 1956
- Breuer, H., W.Nocke: Klin.Wschr. 187, 1957
- Brooks, C.J.W., J.K.Norymberski:
Biochem.J. 55, 371, 1953
- Buehler, H.J., P.A.Katzman, E.A.Doisy:
Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 78, 3, 1951
- Burton, R.B., A.Zaffaroni, E.H.Kentmann:
J.Biol.Chem. 188, 763/193, 769, 1951
- Bush, I.E.: J.Endocrinol. 9, 95, 1953
- Bush, I.E., A.A.Sandberg:
J.of Biol.Chem. 205, 783, 1953
- Callow, N.H., R.K.Callow, C.W.Emmens:
Biochem.J. 32, 1312, 1938
- Caroll, K.K., H.T. Mc Alphine, R.L.Noble:
Canad.Med.Assoc.J. 65, 363, 1951
- Chen, Ch., J.Wheeler, H.E.Tewell, jr.:
J.Lab.Clin.Med. 42, 749, 1953
- Cohen, S.L., I.B.Onesson: J.Biol.Chem. 204, 245, 1953
- Cohen, S.L.: J.Biol.Chem. 192, 147, 1951
- Connel, A.M., J.Copper, J.W.Redfearn:
Acta Endocrinol.(Kopenh.) 27, 173, 1958
- Cope, C.L., S.Mc Crae: Brit.Med.J. 29, 762, 1951
- Corcoran, A.C., L.H.Page, H.P.Dustan:
J.Lab.Clin.Med. 36, 297, 1950
- Corcoran, A.C., L.H.Page:J.Lab.Clin.Med. 33, 1326, 1948
- Cox, R.I.: Biochem.J. 52, 339, 1952
- Crabbé, J., J.Hertoghe: Acta Clin. Belg. 10, 369/397, 1955
Acta Endocrinol. 20, 139, 1955

- Curran, G.L.: L.Biol. Chem. 191, 775, 1951
- Daughaday, W.H., H.Jaffee, R.H.Williams:
J.Clin.Endocrinol. 8, 166, 1948
- Desaulles, P., J.Tripod, W.Schüler:
Schweiz.Med.Wschr. 83, 1088, 1953
- Diczfalusy, E., G.Birke, L.O.Platin:
Klin.Wschr. 225, 1956
- Diczfalusy, E., L.O.Platin, G.Birke, A.Westman:
Acta Endocrinol. (Kopenh.) 18, 356, 1955
- Dingemanse, E., H.Borchardt, E.Laqueur:
Biochem.J. 31, 500, 1937
- Dobriner, K., S.Lieberman:
Recent Progr. in Horm.Res. 6, 71, 1948
- Dorfmann, R.I.: Ann.New York Acad.Sci. 61, 291, 1955
- Dorfmann, R.I.: J.Clin. Endocrinol. 14, 318, 1954
- Drekter, I.J., A.Heisler, G.R.Scism, S.Stern, S.Pearson, T.H.
Mc. Gavack:
J.Clin.Endocrinol. 12, 55, 1952
- Dustan, H.P., H.L.Mason, A.C.Corcoran:
J.Clin.Invest. 32, 60, 1953
- Eik-Nes, K., A.A.Sandberg, F.H.Tyler, C.T.Samuels:
Acta Endocrinol. (Kopenh.) 18, 244, 1955
- Everse, J.W.R., P. de Fremery:
Acta Neerl. Physiol. 2, 152, 1932
- Fieser, L.F., M.Fields, S.Liebermann:
J.Biol.Chem. 156, 191, 1944
- Forbes, A.P., G.C.Griswald, F.Albright:
J.Clin.Endocrinol. 10, 230, 1950
- Fraser, R.S.: J.Clin.Endocrinol. 1, 234, 1941

- Gibson, E., K.H.Evelyn: J.Clin.Invest. 17, 159, 1952
- Girard, A., G.Sandulesco: Helv.Chim.Acta 19, 1095, 1936
- Gornald, A.G., M.P.Mc Donald:
J.Biol.Chem. 201, 279, 1953
- Graf, U., H.J.Henning: Formeln und Tabellen d. Mathem.
Statistik, Springer-Berlag, 1953
- Grant, G.A., D.Beall: Recent Progr. in Horm. Res. 5, 307, 1950
- Gross, E.: Klin.Wschr. 929, 1956
- Gross, F., H.Gysel: Acta Endocrinol. (Kopenh.) 15, 199, 1954
- Grundy, H.M., S.A.Simpson, J.F.Tait:
Acta Endocrinol. (Kopenh.) 11, 199, 1952
- Hamburger: Acta Endocrinol.(Kopenh.) 9, 129, 1952
- Harrop, G.A.jr., J.J.Pfiffner, A.Weinstein, W.W.Swingle:
Proc.soc.Exper.Biol.Med. 29, 449, 1931
- Hartman, F.A., K.A.Brownell:
The Adrenal Gland (Lea a Febinger)
Philadelphia 1949
- Hartman, F.A., L.A.Lewis, J.Thatcher:
Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 48, 60, 1941
- Hartman, F.A., K.A.Brownell, A.A.Crosby:
Amer.J.Physiol. 98, 674, 1931
- Hartman, F.A., G.W.Thorn:
Proc. Soc.Exper.Biol.Med. 28, 94, 1930
- Heard, R.D.H., H.Sobel, E.H.Venning:
J.Biol. Chem. 165, 687, 1946
- Hechter, O.: Ciba Found. Coll. on Endocrinol. 7, 161,
1953
- Hechter, O., G.Pincus: Physiolog.Rev. 34, 459, 1954

- Hechter, O., A.Zaffaroni, R.P.Jacobsen, H.Levy, R.Jeanloz,
V.Schenker, G.Pincus:
Recent Progr. in Hormon Res. 6, 215, 1951
- Hellman, L., H.L. Bradlow, J.Adelman, P.K.Fukushima, J.L.Kulp,
T.F.Gallagher:
J.Clin.Invest. 33, 1106, 1954
- Hershberg, E.B., J.K.Wolfe:
J.Biol.Chem. 133, 667, 1940
- Hill, S.R.: u.a.: Arch.Int.Med. 97, 269, 1956
- Hills, A.G., P.H.Forsham, C.A.Finch:
Blood 3, 755, 1948
- Hollander, V.P., S.di Mauro, O.H.Pearson:
Endocrinol. 49, 617, 1951
- Holtorff, A.F., F.C.Koch:
J.Biol.Chem. 135, 277, 1940
- Hudson, B.P., M.E.Lombardo:
J.Clin.Endocrinol. 15, 324, 1955
- Husslein, H., E.Schüller:
Arch.f.Gynäk. 187, 353, 1956
- Ingle, D.J.: Amer.J.Physiol. 116, 622, 1936
- Jones, N., K. Dobriner: Vitamins a.Hormones 7, 293, 1949
- Kahnt, F.W., R.Neher, A.Wettstein:
Experientia, Basel 11, 446, 1955
- Kahnt, F.W., A. Wettstein:
Helv. Chim. Acta 34, 1790, 1951
- Kersten, H., W.Kersten, H.J.Staudinger:
Biochem. Z. 327, 284, 1955
- King, N.B., H.L.Mason:
J. Clin. Endocrinol. 10, 479, 1950

- Kölitz, E., H. Zeisel: Zsch.f.Khk. 73, 389, 1953
- Koller, S.: Graph.Tafeln z. Beurteilung stat.Zahlen,
Theod.Steinkopf, Dresden u.Leipzig, 1943
- Kutz, R.L.: Proc.soc.Exper.Biol.Med.29, 91, 1931
- Langenbach, H., K.Schreiber:
Z.f.Khk. 77, 227, 1955
- Laros, K.: Z.Inn.Med. 10, 641, 1955
- Levin, M.E., W.H.Daughadai, R.Bremer:
J.Labor a Clin.Med. 45, 833, 1955
- Lieberman, S., B.Mond, E.Smyles:
Recent Progr. in Horm. Res. 9, 113, 1954
- Lieberman, S., S.Teich: J.Clin.Endocrinol. 13, 1140, 1953
- Lindner, A.: Planen und Auswerten von Versuchen:
Verlag Birkhäuser, Basel/Stuttgart, 1953
- Llaurado, J.G.: Klin.Wschr. 669, 1956
- Löwenstein, B.E., A.C.Corcoran, I.H.Page:
Endocrinol. 39, 82, 1946
- Luetscher, J.A. jr., R.H.Curtis:
Ann.Int.Med. 43, 658, 1955
- Luetscher, J.A. jr., A.Dowdy, J.Harvey, R.Neher, A.Wettstein:
J.Biol.Chem. 217, 505, 1955
- Luetscher, J.A. jr., R.H.Curtis:
Federat.Proc. 14, 746, 1955
- Luetscher, J.A. jr., B.J.Axelrad:
Proc.Soc.Exper.Biol.a.Med. 87, 650, 1954
- Mach, R.S., J.Fabre, A.Duckert, R.Borth, Ducommun:
Schweiz.Med.Wschr. 84, 407, 1954

- Markus, F., L.P.Romanoff, G.Pincus:
Endocrinol. 50, 286, 1952
- Matson, Ch. F., Longwell, B.B.:
J.Clin.Endocrinol. 9, 646, 1949
- Müller, A.F., E.Mach, H.Naegeli:
Acta Endocrinol.(Kopenh.) 20, 113, 1955
- Neher, R., A.Wettstein: J.Clin.Invest. 35, 800, 1956
- Neher, R., A.Wettstein: Helvet.Chim.Acta 34, 2278, 1951
- Nelson, D.H., L.T.Samuels:
J.Clin.Endocrinol. 12, 519, 1952
- Norymberski, J.K., R.D.Stubbs, H.F.West:
Lancet 27, 1276, 1953
- Norymberski, J.K.: Nature 170, 1074, 1952
- Read, C.H., E.H.Venning, M.P.Rippstein:
J.Clin.Endocrinol. 10, 845, 1950
- Reddy, W.J., D.Jenkins, G.W.Thorn:
Metabolism 1, 511, 1952
Metabolism 3, 489, 1954
- Reichstein, T., C.W.Shoppee:
Vitamins a. Hormones 1, 345, 1943
- Reinecke, R.M., E.C.Kendall:
Endocrinol. 32, 505, 1943
- Rivoire, R., J.Rivoire, J.Poujel:
J.Biol.Chem. 213, 11, 1955
- Romanoff, L.P., Hudson, P., G.Pincus:
J.Clin.Endocrinol. 13, 1546, 1953
- Romanoff, L.P., J.Plager, G.Pincus:
Endocrinology, 45, 10, 1949

Rosenkilde, H., W.Schroeder:

Zschr.f.Vit.-Horm.u.Ferm.Forschung
8, 132/250, 1956

Parviainen, S., K.Soiva, S.Vartiainen:

Acta Obstetr. Scand. (Stockh.) 29, 3, 1950

Pincus, G.:

Ann. New York Acad.Sci. 61, 283, 1955

Pincus, G., E.B.Romanoff: Ciba Found. Coll. Endocrinol.8, 97, 1955

Pincus, G., L.P.Romanoff, J.Carlo:

J.Endocrinol. 8, 221, 1948

Porter, C.c., R.H.Silber: J.Biol.Chem. 210, 923, 1954

Porter, C.C., R.H.Silber: J.Biol.Chem. 185, 201, 1950

Samuels, L.T.:

Ciba Found, Coll.Endocrinol. 8, 320, 1955

Sandberg, A., D.H.Nelson, E.M.Glenn, F.H.Tyler, L.T.Samuels:

J.Clin.Endocrinol. 13, 1445, 1953

Schild, W.:

Klin.Wschr. 326, 1954

Schmidt, H., Hj.Staudinger:

Biochem. Z. 325, 228, 1954/326, 469, 1955

Schüller, E.:

Acta Endocrinol.(Kopenh.) 21, 281, 1956

Schüller, W., P.Desaulles, R.Meier:

Exper. 10, 142, 1954

Schreier, K., B.Kadelis, T.Zarska:

Klin.Wschr. 30, 1952

Schroeder, W., K.D.Voigt:

2.Acta Endocrinol.Congress, Oslo, 1956

Selinger, H.:

Z.Inn.Med. 10, 1060, 1955

Selye, H.v.:

Med.Welt 1, 1, 1951

Silber, R.H., C.C.Porter: J.Biol.Chem. 210, 923, 1954

Simpson, S.A., J.F.Tait:

Recent Progr.in Horm.Res.11, 183, 1955

- Simpson, S.A., J.F. Tait, A. Wettstein, R. Neher, J.v. Euw,
O. Schindler, T. Reichstein:
Helvet. Chim. Acta 37, 1163, 1954
- Simpson, S.A., J.F. Tait:
Endocrinol. 50, 150, 1952
- Speirs, R.S., J.F. Tait, S.A. Simpson:
Endocrinol. 54, 1954
- Speirs, R.S., R.K. Meyer:
Endocrinol. 45, 403, 1949
- Speirs, R.S., R.K. Meyer:
Endocrinol. 48, 316, 1951
- Spiegelhoff, W., D. Weber, K.H. Wiedehage, O. Ortiz:
Acta Endocrinol. (Kopenh.) 18, 47, 1955
- Sprechler, M.:
Acta Endocrinol. (Kopenh.) 4, 205, 1950
6, 133, 1951
- Staudinger, Hj., M. Taugner, W. Weiss:
Klin. Wschr. 32, 330, 1954
- Staudinger, Hj., V. Bauer:
Klin. Wschr. 32, 1082, 1954
- Staudinger, Hj., M. Schmeisser:
Biochem. Z. 321, 83, 1950
- Staudinger, Hj., M. Schmeisser:
Z. Physiol. Chem. 283, 54, 1948
- Sthlfauth:
Klin. Wschr. 676, 1954
- Sweat, M.L.:
Anal. Chem.: 26, 773, 1954
- Sweat, M.L., W.E. Abbott, W. Jeffries, E.L. Bliss:
Fed. Proc. 12, 141, 1953
- Swingle, W.W., M. Ben, R. Maxwell, C. Baker, E. Fedor, C. Barlow:
Endocrinol. 54, 698, /55, 813, 1954

- Talbot, N.B., F. Albright, A.H. Saltzman:
J. Clin. Endocrinol. 7, 331, 1947
- Talbot, N.B., A.H. Saltzman, R.L. Wixom, J.K. Wolfe:
J. Biol. Chem. 160, 535, 1945
- Talbot, N.B., I.V. Eittington:
J. Biol. Chem. 154, 605, 1944
- Talbot, N.B., J. Ryan, J.K. Wolfe:
J. Biol. Chem. 148, 593, / 151, 607, 1943
- Talbot, N.B., A.M. Butler, E.A. McLachlan, R.N. Jones:
J. Biol. Chem. 136, 365, 1940
- Tamm, J.:
Klin. Wschr. 346, 1956
- Tomsett, S.L., O.C. Smith:
Acta Endocrinol. (Kopenh.) 20, 303/311, 1955
- Tuchmann - Duplessis, H.: Wien. Klin. Wschr. 772, 1955
- Tyler, F.H., C.J. Migeon, H. Castle:
Ciba Found. Coll. Endocrinol. 8, 254, 1955
- Venning, E.H.:
J. Clin. Endocrinol. 11, 769, 1951
- Venning, E.H., V.E. Kazmin, J.C. Bell:
Endocrinol. 38, 79, 1946
- Vestergaard, P., R. Leverett:
Acta Endocrinol. 25, 45, 1957
- Vestergaard, P.:
Acta Endocrinol. 13, 241, 1953
- Vestergaard, P.:
Acta Endocrinol. 8, 193, 1951
- Voigt, K.D., W. Schroeder, I. Beckmann, H. Rosenkilde:
Dtsch. Arch. Klin. Med. 202, 1, 1955
- Voigt, K.D., W. Schroeder, I. Beckmann:
Acta Endocrinol. (Kopenh.) 18, 325, 1955
- Wilson, H.:
Arch. Biochemistry 52, 217, 1954

- Wolfson, W.O.: J.Clin.Endocrinol. 14, 814, 1954
- Zeisel, H., J.Ströder: Münch.Med.Wschr. 1715, 1957
- Zeisel, H., E.Kölitz, J.Ströder:
Zschr.f.Khk. 75, 84,/ 417, 1954
- Zeisel, H., M.Pressler: Zschr.f.Khk. 73, 615, 1953
72, 675, 1953
- Zimmermann, W.: Z.Physiol.Chem. 245, 47, 1936
233, 257, 1935
- Zimmermann, W., H.Anton, D.Pontius:
Hoppe-Seyler's Zschr.f.physiol. Chem.
289, 1952

L E B E N S L A U F

Am 29. Mai 1932 wurde ich in Würzburg als Tochter des damaligen Postrats Dipl.Ing. Georg Herzer und seiner Gattin Anna, geb. Burkhardt, geboren.

Nach 4 Klassen Volksschulzeit in München-Pasing trat ich 1943 in die dortige Mädchen-Oberrealschule über und absolvierte nach 8 Klassen im Jahre 1951. Danach besuchte ich 1 Jahr die städt. Frauenarbeitsschule in München. Im Wintersemester 1952/53 begann ich mein medizinisches Studium an der Universität München. Mit Ausnahme des Wintersemesters 1955/56 in Innsbruck, studierte ich in München. Im April 1957 habe ich geheiratet.

Nach dem 12. Semester legte ich in München im Winter 1958/59 die ärztliche Prüfung ab und promovierte im März 1959.

